

doi: 10.7541/2023.2023.0066

基于无壳孵化黄喉拟水龟胚胎发育活体观察

徐昊旻^{1,2} 洪孝友¹ 魏成清¹ 刘毅辉¹ 李伟¹ 朱新平^{1*} 刘晓莉^{1*}

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 农业农村部热带亚热带水产资源利用与养殖重点实验室, 广州 510380;
2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 文章以黄喉拟水龟(*Mauremys mutica*)受精卵为材料, 通过无壳孵化技术, 对黄喉拟水龟胚胎发育进行活体观察, 并记录胚胎发育全过程。在孵化温度为 $(32\pm 0.5)^{\circ}\text{C}$ 时, 孵化期平均为54d。在没有卵壳、没有外界水分和氧气的情况下, 黄喉拟水龟胚胎能够完成发育全过程并成功孵出稚龟。根据胚胎发育的形态特征、时间将整个发育过程划分为1—19期。1—7期以卵黄囊血管丛、心脏形态与跳动作为分期依据; 而8—19期主要以头部、四肢、背甲、颜色和尿囊等作为分期依据。无壳孵化技术在龟类胚胎发育观察中的成功应用, 显示其有广泛的潜在应用前景。

关键词: 无壳孵化; 胚胎发育; 活体观察; 黄喉拟水龟

中图分类号: S917.4

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2023)11-1869-08



近年来在鸟类中兴起的无壳人工孵化技术在医疗和精细化工等领域中发挥了重要作用。无壳孵化是一项备受关注的无壳孵化技术, 是人工孵化领域的一次重大突破。无壳孵化对于推动孵化科技及生命科学的进一步发展具有里程碑式的意义^[1]。鸡胚因发育过程清楚, 长久以来作为基础和应科学领域重要的实验模型, 尤其在鸡胚发育早期绒毛尿囊膜阶段, 因其血管丰富, 是天然的免疫缺陷宿主, 也是病理学、药理学和肿瘤学等研究领域的理想实验模型^[2, 3]。然而, 关于龟鳖等爬行动物的无壳孵化研究却鲜有报道。野外条件下龟鳖繁殖时, 会在沙土上挖窝产卵, 产卵后用后肢扒土将卵埋上离开, 无护卵行为, 卵自然孵化。在人工养殖时, 为了提高孵化率, 通常在龟鳖自然产卵后收集受精卵, 置于孵化箱, 埋于孵化介质如沙土和蛭石中, 并维持适宜的孵化温度和湿度进行孵化。

胚胎发育是受精完成后, 受精卵细胞根据染色体上遗传信息, 以一种严格的程序有条不紊地生长发育直至形成个体的过程。胚胎发育是新生命的起点, 也是发育生物学的核心问题之一。龟类胚胎发育的研究起始于Rathke和Agassiz等^[4]学者。随后的研究者对多种龟类如拟鳄龟(*Chelydra serpentina*)、西部锦龟(*Chrysemys picta bellii*)和红耳龟(*Trachemys scripta*)胚胎发育过程的描述大多都是将发育中的胚胎从受精卵中取出后固定观察^[5-7]。黄喉拟水龟(*Mauremys mutica*)是我国大宗淡水养殖龟类, 研究材料比较容易获得。在前期研究中, 赵伟华等^[10]利用Bouin's固定液对黄喉拟水龟胚体进行了固定, 再通过石蜡包埋切片及HE染色进行观察后将黄喉拟水龟胚胎发育分为了22个时期, 该方法存在需取样多个受精卵且每个发育阶段受精卵观察后即死亡的缺点。在本研究中, 我们以黄喉拟水龟为研究对象, 通过无壳孵化技术对其活体的

收稿日期: 2023-02-27; 修订日期: 2023-04-18

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金(2022A1515012274和2020A1515110659); 广州市科技计划项目(201904010172 和 202206010070); 中国-东盟海上合作基金(CAMC-2018F); 中国水产科学研究院(珠江水产研究所)科技创新团队(2020TD35和 2020ZJTD01)资助 [Supported by the Basic and Applied Basic Research Fund of Guangdong Province (2022A1515012274 and 2020A1515110659); Guangzhou Science and Technology Plan Project (201904010172 and 202206010070); China-ASEAN Maritime Cooperation Fund (CAMC-2018F); Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020TD35 and 2020ZJTD01)]

作者简介: 徐昊旻(1999—), 男, 硕士研究生; 主要从事水产动物育种研究。E-mail: 18457173557@163.com

通信作者: 朱新平(1964—), 男, 研究员; 主要从事水产动物育种研究。E-mail: zhuxinping_1964@163.com 刘晓莉(1988—), 女, 博士, 助理研究员; 主要从事水产动物育种研究。E-mail: liu_xiaoli1988@126.com *为共同通信作者

胚胎发育进行了全程连续的观察与记录, 以期为龟类胚胎发育机制的研究提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

黄喉拟水龟受精卵均取自中国水产科学研究院珠江水产研究所龟类繁育场。孵化设备选用恒温孵化箱(泰宏珠江牌250升孵化箱FHX—250)。另准备180 mL容量的一次性塑料杯, 一次性橡皮筋(直径6.5 cm), 30 m×30 cm聚乙烯材质保鲜膜(PE), 酒精棉球, 15 cm扁圆型镊子、灭菌水等工具提前进行紫外线照射30min灭菌。

1.2 黄喉拟水龟受精卵无壳孵化操作方法

在黄喉拟水龟繁殖高峰期(5—7月), 选取当天产的经过光照观察卵黄下沉具有可孵化性的黄喉拟水龟受精卵, 洗净并用酒精擦拭消毒后置于超净台中。如图1所示, 在一次性塑料杯中装入一半体积的灭菌水(步骤一)。将具有防透水、隔菌功能的保鲜膜套入装好灭菌水的一次性塑料杯中, 拉伸成形为凹状、无褶皱的结构, 深度2—3 cm, 悬空, 用橡皮筋固定(步骤二)。随后在超净台中用镊子小心剥开受精卵, 将内容物打入凹状结构中。包裹内容物的保鲜膜被杯口托起形成与真实卵壳相同的立体结构和弧度(步骤三)。最后用保鲜膜将塑料杯口水平封住, 无褶皱, 并再次用橡皮筋固定, 固定处涂抹酒精消毒(步骤四)。放置于恒温孵化箱中孵化, 控制孵化温度为 $(32\pm 0.5)^{\circ}\text{C}$, 设置孵化箱湿度为80%左右。每隔24h用手机(OPPO Reno Z自带普通拍照模式)拍照记录胚胎的发育情况。

2 结果

2.1 无壳孵化

已知传统的辨别受精卵方法通常是以卵中部乳白色受精斑作为正常受精判别特征, 出现受精斑

通常需要24—72h。若挑选带受精斑的龟卵在剥离卵壳时都容易散黄, 极易失败。而且时间越长, 卵清和卵黄越容易附着在卵壳上, 难以剥离。经过多次反复试验, 确定最佳去壳时间为当天产出6h以内的受精卵。在受精斑出现前, 如何判断受精卵? 经过对比观察发现, 刚产出不久的受精卵在光照下可以观察到卵黄是下沉的, 而不受精的卵黄则悬浮于中央, 未下沉(图2)。以此为依据, 本次实验选取了10个受精卵, 剥离卵壳, 在 $(32\pm 0.5)^{\circ}\text{C}$ 下, 孵化出稚龟7只, 成功率70%, 孵化期平均为54d。孵化积温的变动范围为40704—43776 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{h}$, 平均孵化积温为41472 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{h}$ 。

2.2 胚胎发育的分期及依据

在 $(32\pm 0.5)^{\circ}\text{C}$ 恒温孵化下, 参考前人的分类依据, 根据胚胎发育的孵化时间, 胚胎大小、形态特征, 将黄喉拟水龟的发育分为19个时期。1—7期以卵黄囊血管丛、心脏形态与跳动作为分期依据; 而8—19期主要以头部、四肢、背甲、颜色和尿囊等作为分期依据。

2.3 胚胎发育过程与分期

第一期(孵化1—3d) 龟胚中央部分, 肉眼可见外表清亮和半透明的明区。

第二期(孵化4d, 图版 I -A) 卵黄表面出现一些红色小颗粒, 是血管丛的初始结构。

第三期(孵化5d, 图版 I -B) 卵黄囊血管丛发生, 出现一个半径0.8 cm左右的圆环血丝, 中间的胚体清晰可见, 为脊索中胚层管。心脏原基发生, 开始出现轻微跳动。

第四期(孵化6d, 图版 I -C) 血管丛变大, 半径变为1.5 cm左右。胚体呈乳白色, 胚体头部心跳端往外发散出两条较粗一点的血丝, 形成一个闭合圆环。胚体四周往外发散出25—30根左右树枝状细线, 连接圆环。中间胚体变粗, 胚体内有一根比血管丛血丝粗的红色血管。胚体内部血管与外

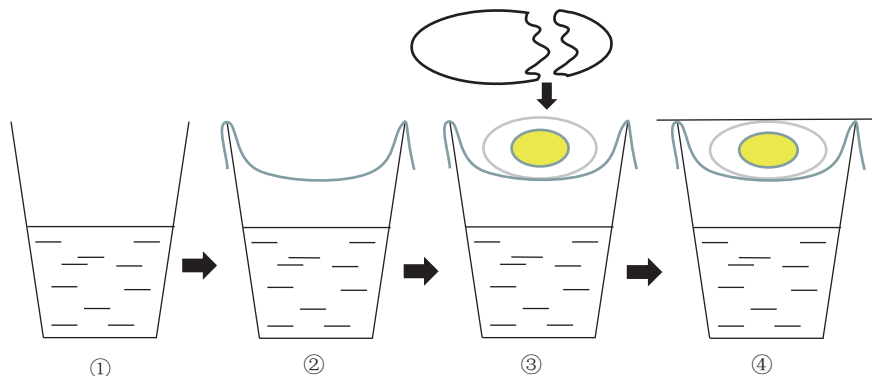


图1 无壳孵化操作示意图

Fig. 1 Schematic diagram of shellless incubation operation

部血管之间联系密切。躯干一端出现心跳, 另一端出现类似后肢和尾巴的雏芽。心脏分化成心房和心室, 呈囊状, 大小与头相当。心脏搏动, 每分钟79下左右。

第五期(孵化7d, 图版 I -D) 血管丛继续变大。躯体变成“L”形。可见胚体头部明显变大, 同时出现眼原基。四肢雏形出现, 尾尖变细。心跳次数略微加快, 每分钟85下左右。卵黄囊血管分支变多, 血液流动更加频繁, 胚胎内部血管与外部血管联系密切。

第六期(孵化8d, 图版 I -E) 卵黄囊血管丛扩大至半径2 cm左右。血液循环加剧。躯体变大, 背部膨胀出现弯曲, 肢芽微突, 尾芽增加。后肠出现。心脏突出于腹外, 心跳次数加快, 每分钟约100下左右。

第七期(孵化9d, 图版 I -F) 卵黄囊血管丛扩大明显, 分支越来越多, 越来越细。尾部体节形成。眼有少量色素沉积。后肠突出形成尿囊原基。心跳次数加快, 每分钟110下左右。

第八期(孵化10d, 图版 I -G) 胚胎上方出现一透明膜状物质, 类似羊膜与尿囊, 但并没有将胚胎包被起来。咽鳃裂出现。枕骨高于额突。枝芽略伸长。

第九期(孵化11d, 图版 I -H) 羊膜变大, 逐渐开始将胚胎包被起来。尿囊肉眼可见, 位于尾端, 凸于胚体上方。胚胎周边血丝略微变粗变明显。视网膜有色素沉积但不是完全的黑色, 呈浅灰色, 瞳孔呈白色。枕骨稍稍突起。前肢突出, 朝向尾部的方向。

第十期(孵化12d, 图版 II -A) 尿囊变大, 内有血丝, 似蚕豆状, 靠近胚胎。眼点色素增加。羊膜变大, 覆盖胚胎。开灯观察时胚胎会自我抽动一两下, 对光源敏感。胚体和四肢增厚且伸长。

第十一期(孵化13—15d, 图版 II -B) 胚体变

大, 头部变大明显, 占躯体约1/3。四肢呈桨状。胚胎周围几根血丝变粗。尾变细长, 弯曲后尖端能接触到尾巴基部。头尾朝同一方向弯曲, 呈“C”状。尿囊增大, 呈气囊状, 血管密布。眼点色素增加。羊膜腔扩大。胚体包被在羊膜内, 胚体卵黄囊血管丛扩大, 直径变为2.5 cm, 该区域毛细血管丰富, 血液循环加剧。胚体透明, 四肢增大。出现咽缝。心脏完全缩于体内, 心跳次数不易统计。

第十二期(孵化16d, 图版 II -C) 卵黄囊血管丛血丝变粗变长。光照观察时会四肢抽动, 对光源敏感。背部侧面出现模糊的褶皱, 同时背甲雏形开始出现。尿囊增大, 呈袋状。指板增大呈乒乓球拍状。枕骨突起与头部前段齐平, 咽缝消失。泄殖突出现突起。

第十三期(孵化17—18d, 图版 II -D) 喙开始形成, 指板变得更加圆, 并有褶皱出现。胚体变得厚实, 胚体头部增大明显, 占躯体比例大于1/3。背甲雏形线条逐渐明显。背甲侧面出现褶皱。四肢开始出现爪子的分化, 即指脊。心跳速率不变。胚体颜色呈半透明。背甲变宽加厚。背甲雏形线条更加明显, 背甲侧面褶皱更加明显。泄殖突突起异常明显。

第十四期(孵化19—20d, 图版 II -E) 指与掌分化明显, 指变长, 尾部出现部分色素沉淀。

第十五期(孵化21—24d, 图版 II -F) 背部色素变多, 手指突出指板的距离大于它的厚度。背甲中线有一突出的龙骨突。背甲、脊柱、胸甲的鳞甲都清晰可见, 背部出现模糊方块。吻端破壳齿明显, 呈雪白色。

第十六期(孵化25—27d, 图版 II -G) 尾部着色加深, 出现黑色。鳞甲边缘有色素沉着。第2—4手指长度是厚度的两倍。蹼与手指之间有轻微界限。背部开始出现模糊的方块, 显微镜下可见手掌出现横向褶皱。

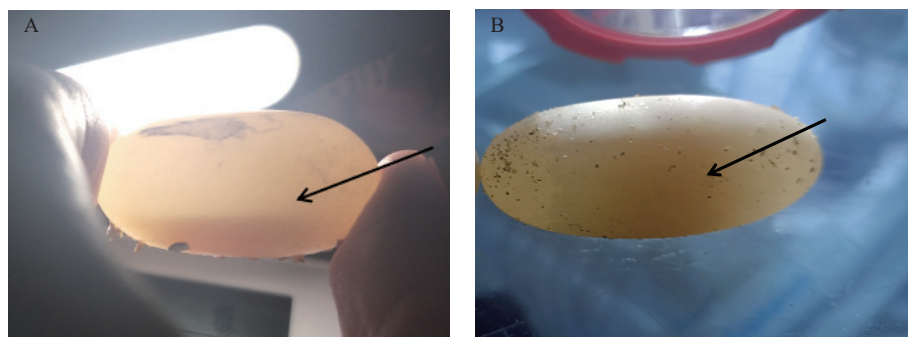


图2 光照下受精龟卵卵黄下沉图(A; ↑表示卵黄下沉位置)和光照下未受精龟卵卵黄图(B; ↑表示卵黄悬浮位置)

Fig. 2 The egg yolk sinking of fertilized turtle eggs under light (A; ↑ shows the position of egg yolk sinking) and the yolk of unfertilized turtle eggs under light (B; and ↑ shows the position of yolk suspension)

第十七期(孵化28—30d, 图版II-H) 四肢爪变细, 指甲变长, 指与蹼之间有凹槽, 指与第十六期明显不同, 前端指骨变细。头部、背部和尾部色素颜色加深, 尾巴出现鳞的轮廓并轻微着色。背部有清晰的方块形纹路。肱盾、胸盾和股盾开始出现色素沉着, 呈淡灰色。

第十八期(孵化31—33d, 图版III-A) 胚体大小约占卵黄的1/2。爪子前段有模糊的白色趾骨, 头部、四肢、肱盾、胸盾、股盾和甲桥色素沉着加深, 呈灰黑色。眼睑能闭合。

第十九期(孵化33d—出壳, 图版III-B、C、D) 胚胎整体形态与出壳后无异, 颜色纹路清晰。胚胎大小与卵黄相同, 卵黄被吸收后逐渐变小。四肢和尾巴表面鳞片纹路清晰, 整个尾巴都有颜色。头部、腹中盾、胸盾、肱盾、甲桥、四肢和尾巴色素大量堆积呈黑色。尿囊中可见淡黄色废液。

2.4 无壳孵出稚龟观察

当观察到卵黄即将吸收干净, 稚龟开始往保鲜膜中排出代谢废物时, 就可以去掉保鲜膜, 将稚龟转移至饲养盒中。从无壳孵化开始至稚龟卵黄吸收干净、脐带脱落后共历时53—55d。3d后投饵, 吃食正常, 状态与正常自然孵化出壳的稚龟无异(图版III-D)。

3 讨论

3.1 龟鳖无壳孵化技术特点

在无壳孵化小鸡实验中, 需要在入孵前加入一定量的乳酸钙来代替卵壳中的钙, 还需要加入青霉素钾和硫酸链霉素达到抑菌目的。另外, 需要改造孵化容器, 增加通风口, 并且在孵化18d后注入氧气, 代替19d鸡胚启用肺呼吸所需的氧气^[1]。对比无壳孵化小鸡, 黄喉拟水龟受精卵无壳孵化方法明显更简便。

由于目前龟鳖类胚胎发育的观察方法多半是直接处于发育的受精卵剖开取出发育的胚胎, 安乐死后进行固定保存观察, 该方法存在以下缺点: 操作耗费受精卵过多, 固定、切片和染色观察等操作复杂耗时长。取出发育中的胚胎观察后, 胚胎即停止发育然后死亡, 不能观察同一个胚胎发育的全过程。例如Mahmoud等^[6]在研究西部锦龟胚胎发育实验中共消耗了675个龟卵。因此, 使用无壳孵化技术进行胚胎发育观察, 可以在不伤害胚胎的情况下连续观察一个完整个体胚胎发育的全过程, 这为未来无壳孵化的龟胚作为基础和应用科学等研究领域的理想实验模型打下技术基础。

3.2 龟鳖胚胎发育分期依据

关于龟类胚胎发育的研究, 国内外都有报道。不同的学者根据不同的标准对龟鳖胚胎发育进行了分期。Yntema^[5]以孵化时间划分鳄龟胚胎发育的过程, 0—3期为无体节时期, 4—10期为体节时期, 11—26为肢体时期。Mahmoud等^[6]描述了西部锦龟胚胎发育分期主要基于形态学变化及胚胎的年龄和大小。Tokita等^[8]依据感觉器官的发育、咽弓的形成、成对体节的数量和附肢的生长划分中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)的胚胎发育进展。由于发育的早期阶段在所有龟类类群中都是类似的, Greenbaum^[7]将红耳巴西龟的第11和第26发育阶段之间选择前肢形态和爪形态作为胚胎分期的标准。谭立军等^[9]研究了乌龟(*Mauremys reevesii*)的胚胎阶段。根据外部形态特征和孵化温度等因素的变化, 分别描述了各阶段的主要形态特征和内部结构, 并就乌龟发育分期的标准: 原肠胚的形成、羊膜尾褶和后羊膜管、早期胚胎的自身运动等问题进行了讨论。赵伟华等^[10]将黄喉拟水龟胚胎发育分为了22期。其中1—7期以卵黄囊血管区、体节数目和心脏形态变化为主要分期依据, 8—22期主要以四肢、背甲和腹甲变化为分期依据。杨志兵等^[11]根据中华条颈龟(*Mauremys sinensis*)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、头部和尾部等的变化为分期依据。王利华等^[12]以中华鳖胚胎的日龄、形态特征和内部结构的变化为主要依据, 从中华鳖卵产出到稚鳖的孵出, 将整个胚胎的发育过程分为26期。第2—13期依据卵黄囊血管区、眼睛和心脏等形态变化进行分期, 14—26期是以四肢、背甲及腹甲的变化特征为主要分期依据。

3.3 无壳孵化与钙、水分、空气吸收的关系

爬行动物的卵壳在其繁殖中起着保护和防止水分散失等重要作用。乌龟卵壳主要由钙质层与壳膜组成。乌龟卵壳的钙质层是由许多霏石结晶体结构的壳单位组成, 气孔就开口于彼此相邻的壳单位之间^[13]。气孔的存在方便了胚胎与外界进行气体交换。在鸟类卵壳中, 卵壳膜是阻止微生物感染胚胎的最后一道防线^[14]。

在无壳孵化时, 无菌操作和无菌保鲜膜的覆盖阻止微生物感染胚胎, 起到担任卵壳膜的作用。钙是脊椎动物胚胎发育过程中需求量最高的矿物元素之一, 对胚胎的健康发育至关重要^[15]。许多专家认为, 龟鳖胚胎发育过程中需要大量的钙, 卵内钙含量常常不能满足胚胎发育的全部需要, 卵壳是胚

胎发育的钙等营养物质的重要来源^[16]。由文辉等^[17]研究证明, 乌龟胚胎发育所需的54.1%的总钙和12.3%的总镁是由卵壳提供的。梁阳阳等^[18]研究发现, 在恒温30℃孵化条件下, 乌龟胚胎发育的第40天, 卵壳开始成为胚胎发育的主要钙源。但是, 在本次无壳孵化试验中并未添加额外物质, 黄喉拟水龟胚胎正常发育并最终成功发育成正常且成活的稚龟个体。该稚龟与自然孵化的稚龟外观上无差异。该研究证明, 卵壳的钙源对胚胎发育成稚龟不是必需的。

在龟鳖孵化时, 介质的湿度对胚胎发育具有重要影响。孵化湿度会影响平背龟(*Natator depressus*)胚胎的孵化成功率^[19]。朱新平等^[20]研究证实, 适当的湿度对孵化管理非常重要。龟卵吸收外界水分对补充卵清中的水分与保证胚胎有效地利用卵黄中贮存的能量具有重要意义^[21]。郭捡红等^[22]研究发现孵化湿度对黄喉拟水龟胚胎发育的影响很小, 但是孵化温度与湿度的相互作用对黄喉拟水龟受精卵的质量增加、孵化成功率和畸形率均有一定影响。在本研究中, 黄喉拟水龟去壳受精卵被保鲜膜封住, 卵内水分与外界没有交流, 卵本身水分支撑了胚胎发育全过程。这说明在受精卵有壳状态下, 外界的湿度主要是起到维持卵内水分不丧失的作用。这与Booth和Yu^[23]报道一致, 即龟卵在孵化过程中水分的增加或减少取决于卵内容物和卵周围基质之间的水蒸气压差。如果卵内部的水汽压小于周围基质的水汽压, 那么卵就会有获得水分的倾向, 但如果卵内部的水汽压大于基质的水汽压, 那么卵就会有失水的倾向。

氧气和温度的相互作用不仅影响中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)胚胎的耐热性和发育速率, 还影响孵化稚龟的健康相关性状^[24]。Lynn和Brand^[25]研究发现随着孵化天数的增加, 东方泥龟(*Kinosternon subrurum subrurum*)、拟鳄龟、三趾箱龟(*Terrapene carolina triunguis*)和东部锦龟(*Chrysemys picta picta*)四种龟的胚胎耗氧量逐渐增加。在孵化后期, 在卵内发育接近成熟的胚胎耗氧量和孵化出的稚龟无异。Gerardo等^[26]研究结果证实了早期发育阶段的锦龟(*Chrysemys picta*)胚胎对缺氧有弹性。Kam^[27]研究发现将佛罗里达红腹龟(*Pseudemys nelsoni*)受精卵30℃孵化19d后浸泡在水中24h, 仍有部分受精卵能继续孵化。詹球等^[28]研究也发现, 乌龟具有极强的抗缺氧生存能力和特殊的抗低氧应激机制。由于去壳受精卵被保鲜膜封住, 卵内与外界空气没有交流, 仅依靠膜内空间所含氧气胚胎也能正常发育, 说明胚胎对外界氧气的要求极低。本研究进一步证明龟鳖具有极强的自我生存能力。

3.4 龟鳖类无壳孵化应用展望

随着黄喉拟水龟胚胎无壳孵化的成功, 无壳孵化龟鳖胚胎有望成为一种新的理想实验模型。依照简单便捷的操作方法可以批量制造出龟鳖胚胎模型来应用于基础和应用科学研究领域。无壳孵化使龟鳖胚胎发育可视化, 未来, 龟鳖胚胎模型作为一种发育遗传研究模型, 与显微观察更好地结合, 能够为龟鳖类胚胎具体发育性状给出分期定义, 制定科学的分期标准。同时, 从育苗层面为龟鳖类新品种选育作出一定的贡献。已知多种龟类属于温度依赖型性别决定(Temperature-dependent sex determination, TSD), 但其背后的分子机制尚未研究透彻。近些年有研究者们通过慢病毒RNA干扰及过表达技术进行与龟鳖类性别分化相关基因的功能验证研究^[29-31]。未来, 龟鳖胚胎模型作为一种可以进行多种分子生物学操作实验的载体模型, 能够帮助找准慢病毒的最佳注射时机, 准确避开胚胎和血管, 以保证慢病毒液吸收效益并提高胚胎成活概率。同时能更直观鉴定病毒组织感染程度, 从而推动龟鳖类性别决定机制方面的研究进展。在无壳孵化操作下, 黄喉拟水龟胚胎耐低氧能力极强, 这种生理特性也许与龟鳖类保持长寿的能力相关。詹球等^[28]通过巴西龟缺氧潜水条件下血气指标检测研究推测, 巴西龟红细胞的携氧能力可约为人的两倍, 暗示巴西龟红细胞和血氧的亲合力更强。已知在(32±0.5)℃孵化温度下, 黄喉拟水龟胚胎在7d就能形成密集的血管丛。其易获取和生长迅速的特点, 有利于推动研究血管形成和血管生物学方面的研究。未来, 龟鳖胚胎模型作为一种生理实验模型, 有望为研究抗衰老医学相关的生理生化机制提供参考。

参考文献:

- [1] Du J E, Dong Z M, Wang G, et al. Preliminary report on chicken embryo shellless incubation [J]. *Sichuan Animal & Veterinary Sciences*, 2021, 48(12): 33-35. [杜金娥, 董志岷, 王贵, 等. 鸡胚无壳孵化研究初报 [J]. *四川畜牧兽医*, 2021, 48(12): 33-35.]
- [2] Wang J, Yang H F, Wang D D, et al. The application and research progress of chicken embryo and avian cell lines in biomedicine [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2020, 47(11): 3783-3791. [王婧, 杨海峰, 王姐姐, 等. 鸡胚及禽类细胞系在生物医药领域的应用及研究进展 [J]. *中国畜牧兽医*, 2020, 47(11): 3783-3791.]
- [3] Qin Y, Ke Y H, Xu H J, et al. Application of chicken chorioallantoic membrane model in toxicity and efficacy assessment of cosmetics [J]. *Detergent & Cosmetics*,

- 2016, **39**(7): 15-20. [秦瑶, 柯逸晖, 徐宏景, 等. 鸡胚尿囊膜模型在化妆品毒性和功效评估中的应用 [J]. 日用化学品科学, 2016, **39**(7): 15-20.]
- [4] Agassiz L. Contributions to the Natural History of the United States of America [M]. Embryology of the Turtle, Boston: Little Brown Press, 1857: 452-455.
- [5] Yntema C L. A series of stages in the embryonic development of *Chelydra serpentina* [J]. *Journal of Morphology*, 1968, **125**(2): 219-251.
- [6] Mahmoud I Y, Hess G L, Klicka J. Normal embryonic stages of the western painted turtle (*Chrysemys picta bellii*) [J]. *Journal of Morphology*, 1973, **141**(3): 269-279.
- [7] Greenbaum E. A standardized series of embryonic stages for the emydid turtle *Trachemys scripta* [J]. *Canadian Journal of Zoology*, 2002, **80**(8): 1350-1370.
- [8] Tokita M, Kuratani S. Normal embryonic stages of the Chinese softshelled turtle *Pelodiscus sinensis* (Trionychidae) [J]. *Zoological Science*, 2001, **18**(5): 705-715.
- [9] Tan L J, Liu J, Chen S Q. A series of stages in the embryonic development of the turtle *Chinemys reevesii* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2001, **25**(6): 605-612. [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.]
- [10] Zhao W H, Zhu X P, Wei C Q, et al. Observation on the embryonic development of yellow pond turtle, *Mauremys mutica* cantor 1842 [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008, **32**(5): 649-656. [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.]
- [11] Yang Z B, Yang P P, He B, et al. Observation on the morphology of embryonic development of Chinese striped-neck turtle, *Mauremys sinensis* [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2011, **39**(33): 20501-20505. [杨志兵, 杨佩佩, 贺斌, 等. 中华条颈龟胚胎发育的形态学观察 [J]. 安徽农业科学, 2011, **39**(33): 20501-20505.]
- [12] Wang L H, Zhang Y P, Ling C, et al. Chinese softshelled turtle *Pelodiscus sinensis*: embryonic development and embryo staging [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2020, **36**(19): 152-158. [王利华, 张英萍, 凌晨, 等. 中华鳖胚胎发育与胚胎分期 [J]. 中国农学通报, 2020, **36**(19): 152-158.]
- [13] You W H, Wang P C, Hua Y. Study on the structure of shells from eggs of *Chinemys reevesii* [J]. *Journal of East China Normal University (Natural Science Edition)*, 1993(2): 99-105. [由文辉, 王培潮, 华燕. 乌龟卵壳结构的研究 [J]. 华东师范大学学报(自然科学版), 1993(2): 99-105.]
- [14] Sahoo G, Sahoo R K, Mohanty-Hejmadi P. Calcium metabolism in olive ridley turtle eggs during embryonic development [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 1998, **121**(1): 91-97.
- [15] Tung M A, Richards J F. Ultrastructure of the hen's egg shell membranes by electron microscopy [J]. *Journal of Food Science*, 1972, **37**(2): 277-281.
- [16] Al-Bahry S N, Mahmoud I Y, Al-Amri I S, et al. Ultrastructural features and elemental distribution in eggshell during pre and post hatching periods in the green turtle, *Chelonia mydas* at Ras Al-Hadd, Oman [J]. *Tissue & Cell*, 2009, **41**(3): 214-221.
- [17] You W H, Wang P C. Study on calcium and magnesium metabolism on embryonic development of Chinese pond turtle (*Chinemys reevesii*) [J]. *Chinese Journal of Zoology*, 1994, **29**(4): 20-22. [由文辉, 王培潮. 乌龟胚胎发育过程中钙, 镁代谢的研究 [J]. 动物学杂志, 1994, **29**(4): 20-22.]
- [18] Liang Y Y, Cui K, Li J, et al. Variation of calcium content in *Chinemys reevesii* during the embryonic development process [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2021, **49**(6): 103-105. [梁阳阳, 崔凯, 李静, 等. 中华草龟胚胎发育过程中钙含量的变化 [J]. 安徽农业科学, 2021, **49**(6): 103-105.]
- [19] Hewavisenthi S, Parmenter C. Influence of incubation environment on the development of the flatback turtle (*Natator depressus*) [J]. *Copeia*, 2001, **2001**(3): 668-682.
- [20] Zhu X P, Chen Y L, Wei C Q, et al. Temperature effects on sex determination in yellow pond turtle (*Mauremys mutica* Cantor) [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2006, **26**(2): 620-625. [朱新平, 陈永乐, 魏成清, 等. 温度对黄喉拟水龟性别决定的影响 [J]. 生态学报, 2006, **26**(2): 620-625.]
- [21] Packard G C, Packard M J. Evolution of the cleidoic egg among reptilian antecedents of birds [J]. *Integrative and Comparative Biology*, 1980, **20**(2): 351-362.
- [22] Guo J H, Zhu X P, Zhao W H, et al. Effects of incubation temperature and substrate humidity on embryonic development of *Mauremys mutica* [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2010, **21**(1): 215-220. [郭捡红, 朱新平, 赵伟华, 等. 温度、湿度对黄喉拟水龟胚胎发育的影响 [J]. 应用生态学报, 2010, **21**(1): 215-220.]
- [23] Booth D T, Yu C Y. Influence of the hydric environment on water exchange and hatchlings of rigid-shelled turtle eggs [J]. *Physiological and Biochemical Zoology: PBZ*, 2009, **82**(4): 382-387.
- [24] Liang L, Sun B J, Ma L, et al. Oxygen-dependent heat tolerance and developmental plasticity in turtle embryos [J]. *Journal of Comparative Physiology B*, 2015, **185**(2): 257-263.
- [25] Lynn W G, Von Brand T V. Studies on the oxygen consumption and water metabolism of turtle embryos [J]. *The Biological Bulletin*, 1945, **88**(2): 112-125.
- [26] Cordero G A, Karnatz M L, Svendsen J C, et al. Effects of low oxygen conditions on embryo growth in the painted turtle (*Chrysemys picta*) [J]. *Integrative Zoology*, 2017, **12**(2): 148-156.
- [27] Kam Y C. Effects of simulated flooding on metabolism

- and water balance of turtle eggs and embryos [J]. *Journal of Herpetology*, 1994, **28**(2): 173-178.
- [28] Zhan Q, Gao J, Li Y, *et al.* Anoxia tolerance, blood physiological and biochemical advantages of the turtles and red-eared sliders during anoxic submergence [J]. *Journal of Natural Science of Hunan Normal University*, 2010, **33**(4): 107-114. [詹球, 高军, 李烨, 等. 乌龟缺氧潜水呼吸的耐受性及巴西龟血液生理生化特性的研究 [J]. *湖南师范大学自然科学学报*, 2010, **33**(4): 107-114.]
- [29] Bao H S, Cai H, Han W, *et al.* Functional characterization of *Cyp19a1* in female sexual differentiation in *Pelodiscus sinensis* [J]. *Scientia Sinica Vitae*, 2017, **47**(6): 640-649. [包海声, 蔡晗, 韩伟, 等. *Cyp19a1* 基因在中华鳖早期卵巢分化中的功能研究 [J]. *中国科学(生命科学)*, 2017, **47**(6): 640-649.]
- [30] Liang X. Functional identification of *Sox9* gene in the early male differentiation of *Pelodiscus sinensis* [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2022: 22-23. [梁肖. *Sox9* 基因在中华鳖早期雄性性别分化中的功能研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2022: 22-23.]
- [31] Zhang Y, Zhang H Y, Zhang H H, *et al.* Functional analysis of *Dmrt1* in temperature dependent sex determination in *Trachemys scripta* [J]. *Scientia Sinica Vitae*, 2016, **46**(6): 735-743. [张一, 张海艳, 张辉皇, 等. *Dmrt1* 基因在红耳龟温度依赖性性别决定中的功能研究 [J]. *中国科学(生命科学)*, 2016, **46**(6): 735-743.]

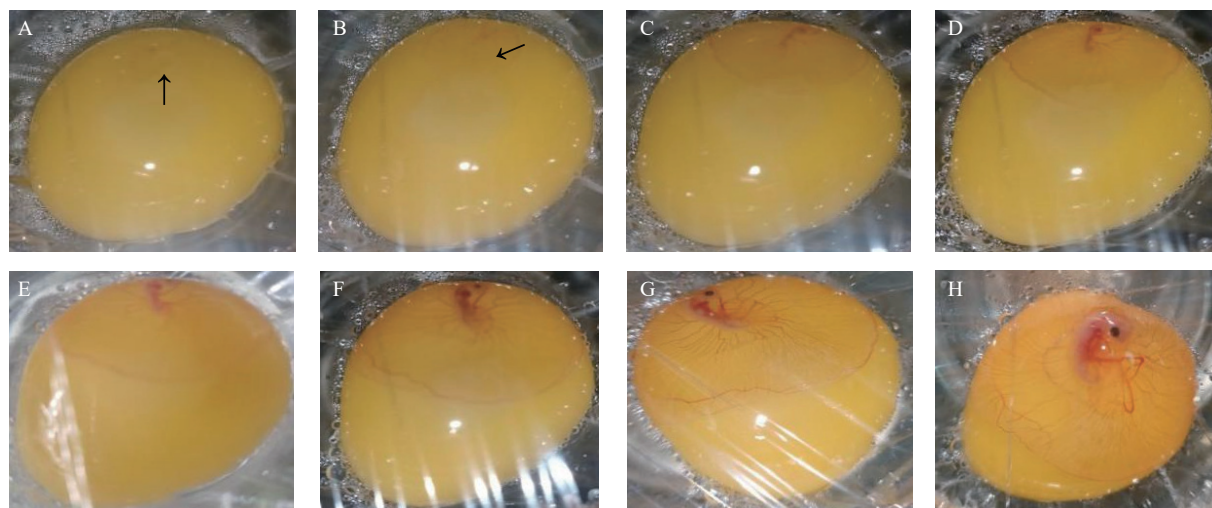
OBSERVATION OF EMBRYONIC DEVELOPMENT OF THE ASIAN YELLOW POUND TURTLE (*MAUREMYS MUTICA*) BASED ON SHELLLESS INCUBATION

XU Hao-Yang^{1,2}, HONG Xiao-You¹, WEI Chen-Qing¹, LIU Yi-Hui¹, LI Wei¹, ZHU Xin-Ping¹ and LIU Xiao-Li¹

(1. Key Laboratory of Tropical and Subtropical Fishery Resources Application and Cultivation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;
2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Shellless hatching technology has been widely used in the field of bird artificial hatching, but it is rarely reported in reptiles. In this paper, the fertilized eggs of the Asian yellow pound turtle (*Mauremys mutica*) were used as the material, the embryo development of *Mauremys mutica* was observed in vivo and the whole process of embryo development was recorded. When the incubation temperature is $(32 \pm 0.5)^\circ\text{C}$, the incubation period is 54d on average. Under the condition of shellless, without external water and oxygen, the embryos of *Mauremys mutica* can complete the whole process of development and successfully hatch young turtles. According to the morphological characteristics and time of embryonic development, the whole development process is divided into 19 stages. Stages 1—7 are based on the vascular plexus of the yolk sac, the shape and beating of the heart as staging criteria; and the main staging criteria for stages 8—19 are the head, limbs, back armor, color, and allantoic sac. This study demonstrates that the calcium source of the egg shell is not essential for embryonic development of turtles. The water content of the egg itself can meet the needs of the entire embryonic development process. Moreover, turtle embryos have extremely strong resistance to hypoxia. The successful application of shellless hatching technology in the observation of turtle embryo development shows that it has a broad potential application prospect. Shellless hatching technology is expected to become a new ideal experimental model. Based on the simple and convenient operation methods, turtle embryo models can be mass-produced for application in basic and applied scientific research fields.

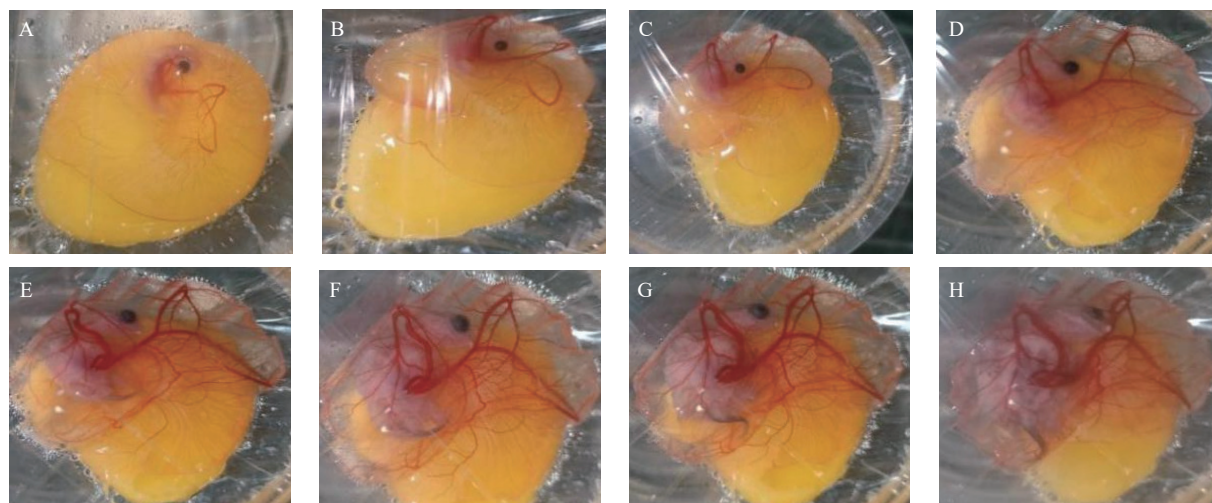
Key words: Shellless hatching; Embryonic development; In vivo observation; *Mauremys mutica*



图版I Plate I

A. 孵化4d; B. 孵化5d; C. 孵化6d; D. 孵化7d; E. 孵化8d; F. 孵化9d; G. 孵化10d; H. 孵化11d; ↑表示血管丛

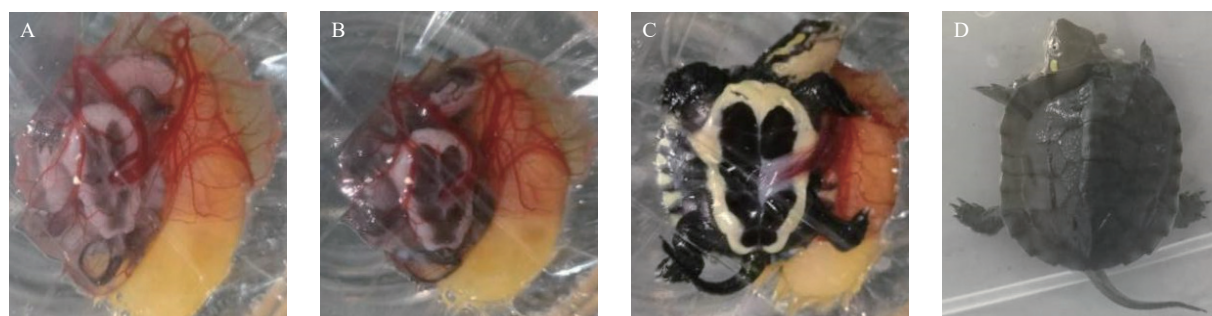
A. 4d embryo; B. 5d embryo; C. 6d embryo; D. 7d embryo; E. 8d embryo; F. 9d embryo; G. 10d embryo; H. 11d embryo; (↑) show vascular plexus



图版II Plate II

A. 孵化12d; B. 孵化15d; C. 孵化16d; D. 孵化18d; E. 孵化20d; F. 孵化23d; G. 孵化25d; H. 孵化28d

A. 12d embryo; B. 15d embryo; C. 16d embryo; D. 18d embryo; E. 20d embryo; F. 23d embryo; G. 25d embryo; H. 28d embryo



图版III Plate III

A. 孵化31d; B. 孵化33d; C. 孵化47d; D. 出壳后

A. 31d embryo; B. 33d embryo; C. 47d embryo; D. the hatching turtle