

# 无尾两栖类性腺发育研究进展

张浓<sup>①</sup> 侯金亮<sup>①</sup> 胡亚洲<sup>①</sup> 向建国<sup>①\*</sup> 潘望城<sup>②</sup>

① 湖南农业大学动物科学技术学院 长沙 410128; ② 常德大北农饲料有限公司 常德 415400

**摘要:** 脊椎动物的性腺发育一直是生物学领域研究的热点, 无尾两栖动物因其胚胎发育的独立性和易观察性而成为发育生物学研究领域的良好材料, 并取得了许多成果。本文综述了无尾两栖类原始性腺形成、性腺分化、精巢和卵巢的发育, 以及配子发生等方面的研究进展。无尾两栖类原始性腺形成主要发生在鳃盖褶和后肢芽形成时期, 不同物种略有不同; 性腺分化通常以卵原细胞或卵巢腔出现为标志, 但对于部分具有初级性腔的物种并不适用; 精巢内支持细胞包围精原细胞形成生精囊, 囊内细胞经过一系列事件最终排出精子; 卵巢由于卵母细胞发育最终卵巢腔消失, 卵母细胞在卵泡内不连续分裂, 最后形成卵细胞。无尾两栖动物的性腺发育过程具有一定相似性, 但不同物种之间存在差异。

**关键词:** 无尾两栖类; 原始性腺; 性腺分化; 配子发生

**中图分类号:** Q492 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2021) 02-290-13

## Gonadal Development in Anuran Amphians

ZHANG Nong<sup>①</sup> HOU Jin-Liang<sup>①</sup> HU Ya-Zhou<sup>①</sup>  
XIANG Jian-Guo<sup>①\*</sup> PAN Wang-Cheng<sup>②</sup>

① College of Animal Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128;

② Changde Dabeinong Feed Co., Ltd, Changde 415400, China

**Abstract:** The development of vertebrate gonads has been extensively investigated. Anuran amphibians are good animal models in the field of developmental biology because of their embryonic development independence and observability. In this paper, we review the research progress on primitive gonad formation, gonadal differentiation and development of testis and ovary, as well as gametogenesis in anuran amphibians. Primitive gonad formation in anuran amphibians occurs mainly during the periods of gill cover fold and hindlimb bud formation, and that different species show slight difference. Gonadal differentiation is usually marked by the presence of oogonia or ovarian cavities, but not for some species with primary sex cavities. Support cells surround the spermatogonia to form a seminal vesicle, and the cells in the vesicle undergo a series of activities to finally discharge the sperm. Ovary is formed eventually, due to the oocyte development and disappearance of ovarian cavity, and the oocyte divides discontinuously within the follicle.

**基金项目** 湖南省教育厅科学研究项目 (No. 18C0170);

\* 通讯作者, E-mail: 2507467211@qq.com;

**第一作者介绍** 张浓, 男, 硕士; 研究方向: 渔业资源与环境; E-mail: 396132409@qq.com。

收稿日期: 2020-08-27, 修回日期: 2020-12-03 DOI: 10.13859/j.cjz.202102014

and finally form egg cells. The gonadal developmental processes in anuran amphibians are similar, but also show differences between species.

**Key words:** Anuran amphibians; Primitive gonads; Gonadal differentiation; Gametogenesis

无尾两栖类性腺发育包括原始性腺的形成、性腺分化、精巢和卵巢发育以及配子发生等过程。虽然无尾目物种数量 7 212 种 (数据来源于: [amphibiaweb.org](http://amphibiaweb.org)), 但对性腺发育过程有准确描述的物种数量不超过 1%。性腺发育是阐明性别决定机制、评估异常发育的基础。

无尾两栖类与其他脊椎动物性腺发育之间存在一定相似性, 同时也其具备独特性。在原始性腺的形成方面, 无尾两栖类 (Aguero et al. 2017)、斑马鱼 (Raz 2003) 和鸟类 (Bertocchini et al. 2016) 的原始生殖细胞 (primordial germ cells, PGCs) 由母系决定, 而有尾两栖类 (Johnson et al. 2015)、爬行类 (Bertocchini et al. 2016) 以及小鼠 (*Mus musculus*) (De Felici 2016) 则是由细胞诱导而成, 原始生殖细胞 (PGCs) 的不同来源对于理解物种进化具有重要意义 (Crother et al. 2016, Whittle et al. 2016)。在性腺分化方面, 无尾两栖类的性别由基因决定, 但也特别容易受到环境因素以及类固醇激素的影响 (Nakamura 2010), 处于典型基因型性别决定 (如哺乳类和鸟类) 和环境型性别决定 (如鳄类和大多数龟类) 中间位置 (Lambert 2018), 这使无尾两栖类在理解性别决定分子机制和性染色体进化方面具有独特地位 (Miura 2017)。在配子发生方面, 无尾两栖类的精子在生精囊内同步发育, 且过程缓慢, 相较于哺乳动物复杂的异步过程 (Griswold 2016), 无尾两栖类可能更有利于精子发生的深入研究 (Pierantoni et al. 2002, Ciaramella et al. 2016)。同时无尾两栖类模型的卵母细胞弥补了哺乳动物模型不易获得卵母细胞以及斑马鱼和人类进化关系较远的缺点, 广泛应用于人类疾病发生的相关研究 (Tandon et al. 2017)。本文综述无尾两栖类性腺发育过程, 旨在为相关研究提供理论参考。

## 1 原始性腺的形成

性腺主要是由生殖细胞和体细胞构成, 无尾两栖类的生殖细胞起源于内胚层的原始生殖细胞 (张天荫 1987), 当原始生殖细胞 (PGCs) 沿着背侧肠系膜完成迁移并嵌入预先形成的生殖嵴时, 标志着原始性腺形成开始 (图 1a~c)。生殖嵴是肠系膜上由体腔上皮构成的一组对称的纵行隆起, 位于中肾管下方腔静脉的腹壁上, 同时生殖嵴的位置在无尾两栖类中是保守的 (Wylie et al. 1976, Ogielska 2009, Piprek et al. 2014a)。通常情况下, 生殖嵴会在原始生殖细胞 (PGCs) 迁移完成前预先形成, 这意味着原始生殖细胞 (PGCs) 并不会诱导生殖嵴的形成 (Hayes 1998), 但在东方铃蟾 (*Bombina orientalis*) (Lopez 1989)、多彩铃蟾 (*B. variegata*) (Piprek et al. 2010)、泽蛙 (*Fejervarya multistriata*) (李桑 2008) 原始生殖细胞 (PGCs) 到达未来性腺位置前, 始终未观察到生殖嵴的形成。虽然生殖嵴没有形态分化, 但普遍认为体腔上皮细胞已经开始分化, 并产生诱导剂, 使原始生殖细胞 (PGCs) 到达最终位置 (Dubois 1968, Piprek et al. 2010)。体腔上皮细胞与原始生殖细胞 (PGCs) 接触后变扁平, 并完全覆盖原始生殖细胞 (PGCs), 成为性腺表面上皮细胞。同时原始生殖细胞 (PGCs) 失去伪足以及运动能力, 从卵黄消失那一刻起, 成为生殖细胞。

当原始生殖细胞 (PGCs) 完成迁移后, 性腺表面上皮增生, 原始性腺生长, 一些细胞向内转移到性腺的内部区域, 在靠近中肾的“近端区域”形成一个具有基底膜的细胞团, 也就是髓质。而远离中肾的“远端区域”包含生殖细胞则成为皮质, 同时来源于中肾的间质细胞也开始进入性腺内, 最后髓质与皮质构成原始

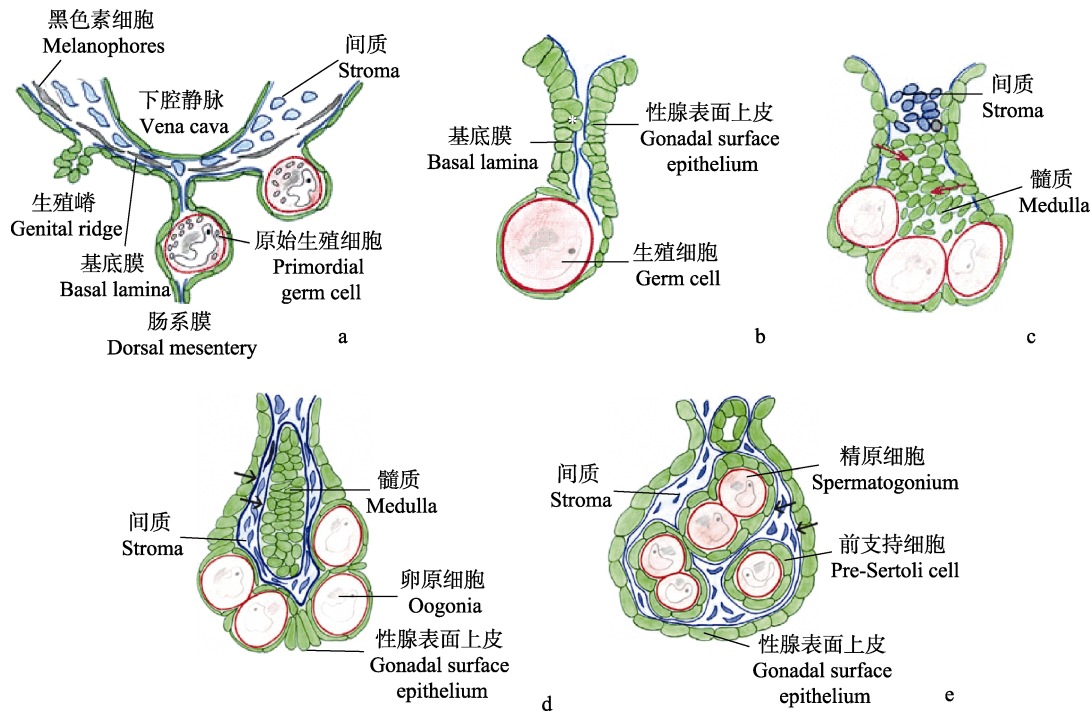


图 1 非洲爪蟾原始性腺的形成和性腺分化示意图（引用自 Piprek et al. 2017）

Fig. 1 Illustration of formation and differentiation of primitive gonads in *Xenopus laevis* (from Piprek et al. 2017)

a. NF (Nieuwkoop et al. 1956) 48 期，原始生殖细胞通过下腔静脉下的肠系膜进入生殖嵴，生殖嵴形成位置的基膜消失，同时间质和黑色素细胞也开始进入肠系膜；b. NF50 期，原始生殖细胞改称为生殖细胞，性腺表面上皮细胞增殖并生成基底膜，并且开始向内部移动，进入位置（星号）的基底膜消失；c. NF52 期，性腺表面上皮细胞全部进入（红色箭头）生殖嵴内部形成髓质，与皮质共同构成原始性腺；d. NF55 期，早期卵巢内，卵原细胞与表面上皮相连，两层基底膜（黑色箭头）将皮质、髓质和间质分隔开来；e. NF55 期，早期精巢内，精原细胞被前支持细胞包围，形成基底膜（黑色箭头），向内渗入的间质把精原细胞与表面上皮完全分离。

a. In NF (Nieuwkoop et al. 1956) 48 stage, primordial germ cells enter the genital ridge through the mesentery under the vena cava, the basement lamina where the genital ridge is formed disappears, and at the same time stroma and melanocytes also enter the mesentery; b. NF50 stage, the primordial germ cells are renamed as germ cells, the gonadal surface epithelial cells proliferate and generate basement lamina forms, and then cells begin to move inward, the basement lamina at the position (asterisk) disappears; c. NF52 stage, all the epithelial cells on the gonadal surface enter the gonad (red arrow) to form medulla, together with the cortex to form the primordial gonad; d. NF55 stage, in the early ovaries, the oocytes are connected to the surface epithelium, and two basement lamina (black arrows) separate the cortex, medulla and stroma; e. NF55 stage, in the early testis, the spermatogonia are surrounded by the pre-Sertoli cells to form a basement lamina (black arrow), and the ingressing stroma separates the spermatogonia from the surface epithelium.

性腺的主要结构。关于髓质细胞的来源，以前有研究认为来自中肾芽基或中肾小管，甚至肾间细胞 (Lopez 1989, Hayes 1998, 李新红等 2001), 但是越来越多的研究提示体腔上皮可能是髓质细胞唯一来源。例如，东方铃蟾和多彩铃蟾二者性腺发育过程类似并且相对特殊，分化早期无明显髓质，Lopez (1989) 认为东方铃

蟾的髓质来源于中肾，然而最近在多彩铃蟾 (Piprek et al. 2010) 中观察到，性腺分化期间体腔上皮增殖分化形成髓质，同时来源于中肾的间质细胞也会进入性腺，因此东方铃蟾中来自中肾的可能是间质细胞，充满在性腺中被误认为是髓质细胞。

本文以 Gosner 分期 (Gosner 1960) 为发

育时间标尺,对已有深入研究的 8 科 23 种的性腺发育重要时期进行总结(图 2),发现无尾两栖类生物,原始性腺的形成、分化、卵母细胞出现的时间存在种间差异。物种包括铃蟾科(Bombinatoridae)东方铃蟾(Lopez 1989)、多彩铃蟾(Piprek et al. 2010),负子蟾科(Pipidae)热带爪蟾(*Xenopus tropicalis*) (El-Jamil et al. 2008)、非洲爪蟾(*X. laevis*) (Piprek et al. 2017),蟾蜍科(Bufonidae)普通蟾蜍(*Bufo bufo*) (Falconi et al. 2004)、花背蟾蜍(*Strauchbufo raddei*) (马玲等 2011),雨蛙科(Hylidae)安第斯高地蛙(*Dendropsophus molitor*) (Pinto-Eraza et al. 2016)、长鼻树蛙(*Scinax fuscovarius*) (Goldberg 2015)、*Pseudis platensis* (Fabrezi et al. 2009),姬蛙科(Microhylidae)饰纹姬蛙(*Microhyla ornata*)

(Mali et al. 2015),叉舌蛙科(Dicroglossidae)普通跳蛙(*Euphylyctis cyanophlyctis*) (Phuge et al. 2013)、泽蛙(李桑 2008)、棘胸蛙(*Quasipaa spinosa*) (梅祎芸等 2018),蛙科(Ranidae)马拉巴尔蛙(*Hydrophylax malabarica*) (Mali et al. 2015)、黑斑蛙(*Pelophylax nigromaculatus*) (Tanimura et al. 1989)、普通水蛙(*Rana esculenta*) (Bartmańska et al. 1999)、池蛙(*P. lessonae*) (Haczkiwicz et al. 2013)、湖蛙(*P. ridibundus*) (Bartmańska et al. 1999)、牛蛙(*Lithobates catesbeiana*) (Chavadej et al. 2000)、短吻蛙(*R. curtipes*) (Gramapurohit et al. 2000)、欧洲林蛙(*R. temporaria*) (Ogielska et al. 2004)、中国林蛙(*R. chensinensis*) (陈伟庭等 2008, 李桑 2008),树蛙科(Rhacophoridae)日本树蛙(*Zhangixalus arboreus*) (Tanimura

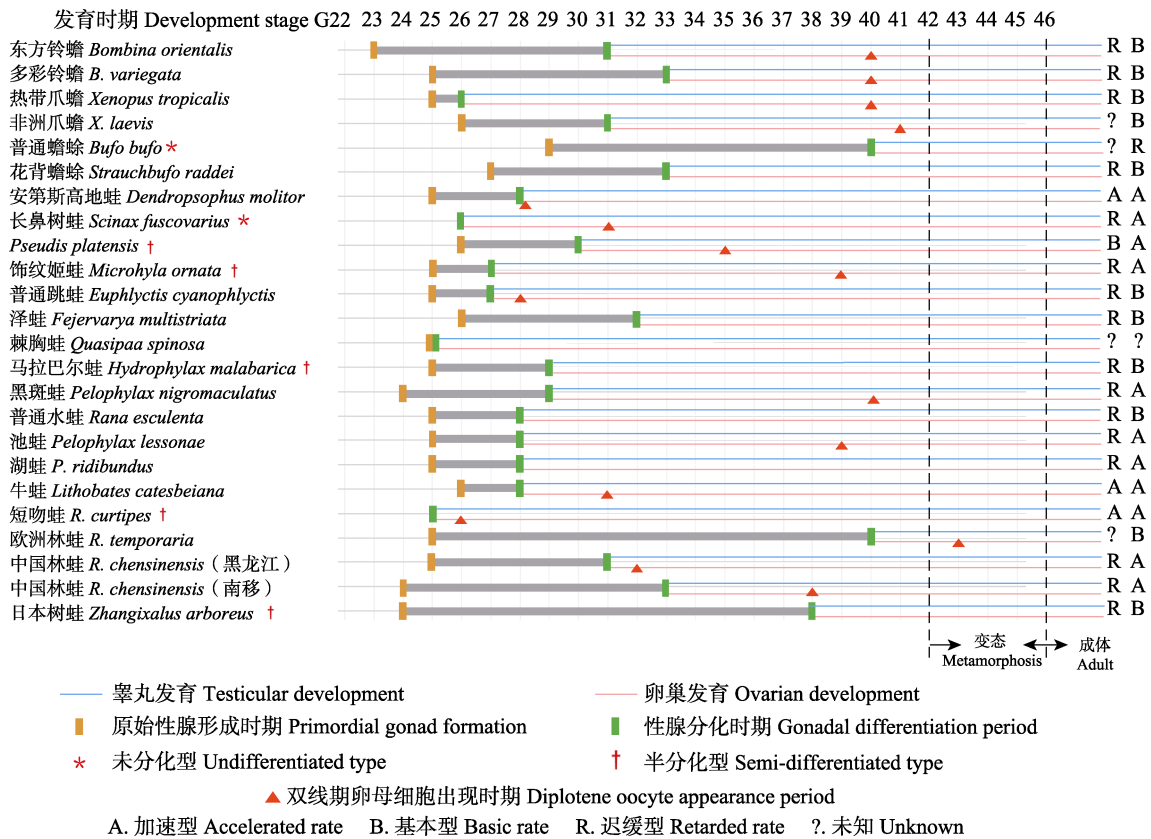


图 2 23 种无尾两栖动物性腺发育时期对比图

Fig. 2 Comparison of the gonadal development stages in 23 species of anuran amphibians

et al. 1989)。

无尾两栖类原始性腺形成集中在 G25 和 G26 期, 此时蝌蚪主要发生鳃盖褶的形成和后肢芽的发育, 因此鳃盖褶和后肢芽可以作为绝大多数物种原始性腺形成的外观标志。但有研究发现在棘胸蛙(梅祎芸等 2018)中, 包括精卵巢早期发育在内的整个早期性腺发育过程都发生在 G25 期。同时也有研究发现, 体细胞的发育与性腺分化的速率只是大致相关, 这意味着物种性腺发育可能有一套独立的时序, 性腺发育仅与年龄有关(Ogielska et al. 2004)。因此我们建议, 在描述物种性腺发育过程时, 参照发育时期表时, 也同时加上准确的发育时间。

总之, 无尾两栖类原始性腺的形成过程已基本清楚, 但是相关调控机制尚未完全了解。一方面, 原始生殖细胞(PGCs)从内胚层主动迁移至生殖嵴涉及一系列精细事件。研究发现, 非洲爪蟾可以减弱细胞与细胞间、细胞与细胞外基质间的黏附性从而使原始生殖细胞(PGCs)获得运动性, 前者通过下调 E-cadherin 表达(Baronsky et al. 2016), 后者则通过降低原始生殖细胞(PGCs)与纤维连接蛋白和 I 型胶原蛋白的亲合力(Dzementsei et al. 2013)。随后在 SDF-1/CXCR4 信号的引导作用下原始生殖细胞(PGCs)迁移到未来性腺位置, 期间驱动蛋白 KIF123B 和生殖质蛋白 XGRIP2 为迁移提供动力(Tarbashevich et al. 2007, Takeuchi et al. 2010, Tarbashevich et al. 2011)。虽然对无尾两栖类原始生殖细胞(PGCs)迁移过程具备了一定的深入认识, 但正常和紊乱迁移的调控机制还不完全清楚, 特别是对原始生殖细胞(PGCs)如何在生殖嵴停止移动这一重要步骤知之甚少(Grimaldi et al. 2020)。另一方面, 生殖嵴的形成同样依赖于相关基因的表达, 但在无尾两栖类中研究较少。在小鼠生殖嵴形成过程中, *Gata4* 和 *Wt1* 基因首先表达, 之后 *Sf1*、*Lhx9*、*Emx2* 和 *Cbx2* 陆续表达(Piprek et al. 2016)。然而在无尾两栖类中, 发现 *Gata4* 和 *Wt1* 能诱导心肌细胞分化(Liu et al. 2016), 其是否参与

生殖嵴形成, 仍有待研究。未来, 无尾两栖类原始生殖细胞(PGCs)的迁移以及生殖嵴形成的分子机制可能会成为研究的重要方向。

## 2 性腺的分化及类型

无尾两栖类性腺分化时期, 通常是依据卵巢特征出现来确定, 在雌性中(图 1d), 生殖细胞位于皮质区域, 没有位置的变化, 但是在性别分化开始后不久, 髓质细胞失去细胞连接, 在性腺中央形成一个明显的空腔, 即卵巢腔。在雄性中(图 1e), 生殖细胞向精原细胞分化, 并向性腺内部移动, 基底膜断裂, 皮质与髓质融合。这种移动过程可能是增殖的表面上皮细胞被动携带精原细胞运动的结果, 同时二者之间的黏附力减弱, 使得精原细胞分散在整个性腺内部(Piprek et al. 2017)。由于较大的卵原细胞以及明显的卵巢腔更容易被观察, 通常被作为性腺分化的标志。但是在普通蟾蜍(Falconi et al. 2004)、花背蟾蜍(马玲等 2011)、泽蛙(李桑 2008)和棘胸蛙(梅祎芸等 2018)的原始性腺中会出现初生性腔结构, 此时便不能通过腔隙来确定性别分化。关于初生性腔的研究, 通常是描述性腺分化过程中初生性腔的结构变化, 即卵巢的分化过程中初生性腔扩大形成卵巢腔, 精巢分化过程中体细胞渗透其中, 导致性腔缩小最后消失。Falconi 等(2004)针对普通蟾蜍性腺分化过程提出“不对称遗传”模型, 即卵巢分化是初级过程, 睾丸分化是次级(衍生)过程。随着物种性腺发育材料不断增多, 一部分无尾两栖类性腺有偏好向雌性分化这一现象愈发明显, 如在 *Pseudis platensis*(Fabrezi et al. 2009)、普通跳蛙(Phuge et al. 2013)、短吻蛙(Gramapurohit et al. 2000)以及牛蛙和欧洲林蛙(Hsü et al. 1970, Rodrigues et al. 2015)的一些没有分化的种群中, 原始性腺先全部发育成为卵巢, 雄性则是通过卵母细胞退化从而形成精巢。所以无尾两栖类的性别存在从偏好雌性向雌雄机会均等进化这一过程, 初生性腔可能是物种适应性别进化的特殊

结构, 关于初生性腺的形成原因报道较少, 还有待进一步研究。

另外, 大多数蟾蜍科物种还存在一个被称为毕德氏器 (Bidder's organs, Bo) 的结构 (Piprek et al. 2013, Sassone et al. 2015), 它由生殖嵴前部发育而成, 结构与卵巢类似, 但没有次级卵巢腔。毕德氏器出现在性腺分化之前, 雌雄幼体中均有形成, 随后通常在雄性成体中保留, 而在雌性成体中消失。雄性蟾蜍毕德氏器位于睾丸前部, 含有不同发育阶段的卵母细胞, 摘除睾丸后, 其可以发育成卵巢, 并产生成熟卵子 (Abramyan et al. 2010)。毕德氏器的作用尚不清楚, 可能与类固醇激素形成有关, 也可能是蟾蜍高繁殖力丧失的产物 (Piprek et al. 2014a)。

无尾类性腺分化速率因种而异, 各不相同, 甚至同一物种中雌雄性腺的分化速率都有差异。Ogielska 等 (2004) 将无尾两栖类卵巢分化划分为 10 个阶段, 并区分了三种分化速率: 基本型, 指变态完成时次级卵原细胞已经开始减数分裂, 或者已经出现双线期卵母细胞, 即到达第 V ~ VI 期; 加速型, 即变态完成时卵巢内充满双线期卵母细胞, 到达第 IX ~ X 期; 迟缓型, 指变态完成时次级卵原细胞仍未进行减数分裂。大多数物种属于基本型。迟缓型物种较少, 目前已见报道的有普通蟾蜍以及绿蟾蜍 (*Bufo viridis*) (Ogielska et al. 2004)。加速型在 Ogielska 等 (2004) 之后的研究中不断被发现, 如 *Pseudis platensis* (Fabrezi et al. 2009)、池蛙 (Haczkiwicz et al. 2013) 和安第斯高地蛙 (Pinto-Erao et al. 2016) 等, 有研究认为安第斯高地蛙所处的低温且多变的生活环境, 是导致性腺分化加速的原因 (Pinto-Erao et al. 2016), 但这在其他物种中并未证实。

依据生精小管分化所处时期, 无尾两栖类精巢分化速率也可分为三种类型 (Goldberg 2015): 基本型, 生精小管在变态期分化; 加速型, 生精小管在变态之前分化; 迟缓型, 生精小管在变态之后分化。大多数两栖无尾类物种

生精小管都在变态后出现, 属于迟缓型, 基本型和加速型较少。

物种性腺分化速率各不相同, 同一物种的精巢和卵巢的分化速率也存在差异。例如池蛙和湖蛙的卵巢同属于加速型, 但是生精小管却是第一次冬眠之后才出现, 同时普通水蛙作为两者的杂交后代 (Bartmańska et al. 1999), 并没有继承亲本的卵巢加速类型, 表现为基本型。虽然性腺分化显示出较大差异, 但有一点可以确认的是精巢加速分化的物种, 卵巢分化肯定也是加速型。反之, 卵巢加速分化的物种, 精巢分化不一定是加速型。

通常认为两栖动物性腺分化有三种模式 (Gramapurohit et al. 2000, Piprek et al. 2014b, Goldberg 2015): 一是分化型, 指原始性腺直接分化为睾丸或卵巢; 二是未分化型, 指原始性腺分化成卵巢, 或者在一段时间内保持未分化状态, 然后分化成为睾丸; 三是半分化型, 原始性腺先分化成为卵巢, 然后遗传雄性通过卵巢发育成为睾丸。然而, 最近的一项研究提出需要对两栖动物性腺分化类型进行重新讨论 (Mali et al. 2015)。他们认为未分化和半分化类型的描述并不明确, 所谓的半分化型只不过是变态前后启动卵母细胞变性的未分化型。而 Phuge 等 (2013) 则认为, 未分化型可以归类为分化型, 因为二者差异似乎是关于时间而不是形态学事件的顺序, 造成这一现象的原因可能是一些研究人员将未分化性腺误判为早期卵巢。我们还发现, 同一物种不同学者将其归类为不同的分化类型, 例如 Tanimura 等 (1989) 认为日本树蛙是半分化类型, 但 Nakamura (2009) 则将其归类为未分化类型, 这是因为后者对分化类型有不同的定义, 分化型与上述相同, 他将未分化型定义为精巢通过卵巢分化, 而半分化型处于二者之间。因此关于两栖动物性腺分化类型的确需要重新讨论 (Eggert 2004)。性腺分化类型最早是由 Witschi (1929) 提出, 其发现欧洲林蛙存在三个不同的性别种群, 分化种群, 雄性分化发生在变态之前; 未

分化种群, 雄性分化发生在变态之后; 半分化种群, 雄性分化发生在变态期间, 未分化种群和半分化种群在睾丸分化之前都经历不同程度的卵巢期, 分化种群则是直接分化。如果从睾丸分化前体判断, 将未分化和半分化类型统一为一种类型是可行的。

综合已有研究, 两栖动物性腺分化模式的归类尚存争议, 很有必要对已有研究物种, 特别是性别分化类型归类为未分化型的物种进一步研讨。笔者认为两栖动物性腺分化类型可分为两种: 分化型, 睾丸由未分化性腺直接分化形成; 未分化型, 睾丸由卵巢间接分化而成。根据雄性分化的时间先后, 未分化型又可分为未分化 A 型(雄性分化出现在变态完成之后)和未分化 B 型(雄性分化出现在变态完成之前, 对应半分化型)。性腺分化类型与系统发育之间并没有表现出明显关系。从图 2 可以发现, 大多数无尾目物种都属于分化型, 只有少数物种属于未分化型或半分化型, 并且无规律地分布在不同的科属中。例如在雨蛙科中, 安第斯高地蛙属于分化型, 而长鼻树蛙属于未分化型, *Pseudis platensis* 属于半分化型。甚至同一物种中都可能出现不同的分化类型, 如牛蛙(Hsü et al. 1970)和欧洲林蛙(Witschi 1929), 前者存在分化型和未分化型两种分化种群, 后者则包括三种分化类型。

### 3 精巢发育和精子发生

无尾目两栖类精巢发育可分为 10 个阶段(Haczkiwicz et al. 2013), 1~3 阶段为未分化性腺; 第 4 阶段, 生殖细胞转化为初级精原细胞, 单个初级精原细胞迅速增殖, 并很快被体细胞(支持细胞前体细胞)包围吞噬形成生精囊; 第 5 阶段, 初级精原细胞继续增殖; 第 6 阶段, 精原细胞与相邻的支持细胞一起形成被间质细胞和胶原纤维包围的生精索, 而髓质细胞开始形成睾丸网; 第 7 阶段, 生精索的直径增加, 睾丸明显, 间质组织和白膜开始分化; 在第 8 阶段, 活跃的精子发生开始, 深染初级

精原细胞和次级精原细胞出现, 发育中的生精索连接睾丸网; 第 9 阶段, 减数分裂开始, 生精索逐渐分化为有内腔的生精小管(图 3), 睾丸网通过直管与生精小管相连; 到第 10 阶段, 生精索全部分化完成, 生精小管构成成年精巢的主要结构。与卵子发生不同, 无尾目雄性个体精子发生是一个连续的过程, 并且和鱼类以及哺乳类精子发生过程相同, 主要包括精原细胞的有丝分裂阶段、精母细胞减数分裂阶段以及精子的形成(Pudney 1995, Yoshida 2016, Haczkiwicz et al. 2017)。雄性个体性腺分化后, 生殖细胞转化成为初级精原细胞, 意味着精子发生的开始。初级精原细胞具有一个较大的核仁, 细胞核形状随物种不同呈现出差异性, 一类物种的细胞核轮廓不规则或呈叶状, 如非洲爪蟾(Al-Mukhtar et al. 1971, Kalt 1976)、*Rhinella spinulosa*(Bustos-Obregon et al. 1973)、*R. arenarum*(Cavicchia et al. 1983)、墨西哥大叶蛙(*Pachymedusa dacnicolor*)(Rastogi et al. 1988)、长鼻树蛙(De Oliveira et al. 2003)和矮蛙(*Physalaemus cuvieri*)(De Oliveira et al. 2002); 而另外一类物种, 如池蛙、泽蛙(Kaptan et al. 2008, Haczkiwicz et al. 2017)和虎纹蛙(*Hoplobatrachus rugulosus*)(Manochantr et al. 2003), 它们的初级精原细胞的细胞核轮廓光滑, 不呈叶状。

初级精原细胞具有淡染初级精原细胞(pale primary spermatogonia)和深染初级精原细胞(dark primary spermatogonia)两种类型。最早研究者是从 *Rhinella spinulosa*(Bustos-Obregon et al. 1973)上观察到这两种初级精原细胞, 随后陆续在非洲爪蟾(Kalt 1976)、普通水蛙(Rastogi et al. 1985)、墨西哥大叶蛙(Rastogi et al. 1988)、普通跳蛙(Pancharatna et al. 2000)、湖蛙和池蛙(Haczkiwicz et al. 2017)等物种被证实。淡染初级精原细胞核染色质均匀, 细胞质透明, 能够自我更新, 具有干细胞的功能, 也能够分化形成深染精原细胞, 因此此类初级精原细胞也被称为精原干细胞

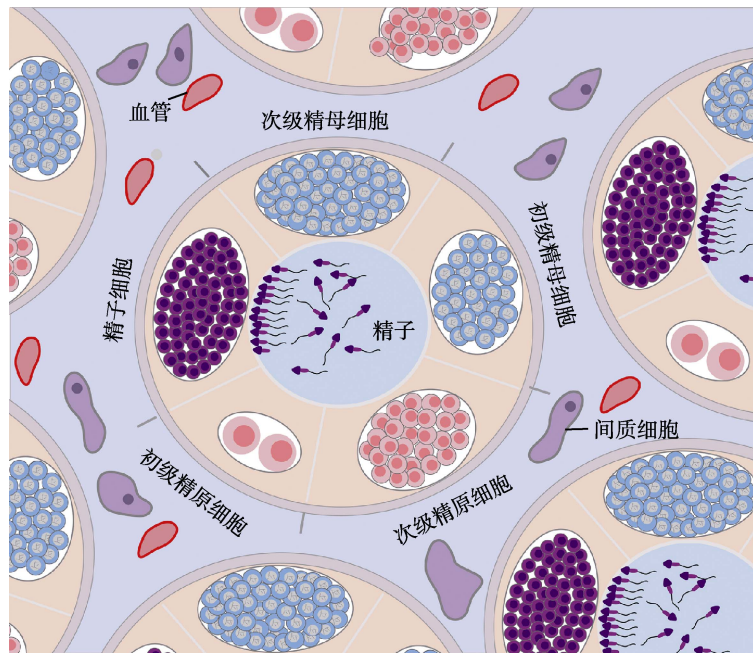


图 3 生精小管示意图 (参考 Haczkiwicz et al. 2017 绘制)

Fig. 3 Illustration of seminiferous tubule (from Haczkiwicz et al. 2017)

初级精原细胞. Primary spermatogonia; 次级精原细胞. Secondary spermatogonia; 初级精母细胞. Primary spermatocyte; 次级精母细胞. Secondary spermatocyte; 精子细胞. Spermatids; 精子. Spermatozoa; 间质细胞. Leydig cell; 血管. Blood vessel.

(permatogonial stem cells, SSCs)。深染初级精原细胞较小, 有深色细胞质和富含异染色质的细胞核, 深染精原细胞分裂形成次级精原细胞。次级精原细胞在生精囊内继续进行有丝分裂, 期间胞质不完全分裂, 次级精原细胞之间由细胞质间桥连接, 与卵母细胞不同的是, 这一细胞连接会保留到早期精子细胞阶段, 而在雌性中会随初级卵泡的形成而断裂(Kalt 1976, Rastogi et al. 1980, Kloc et al. 2004, Haczkiwicz et al. 2017)。精原细胞经历最少 3 次最多 9 次有丝分裂后开始减数分裂, 精子发生进入精母细胞阶段 (Rastogi et al. 1988, Takamune et al. 2001, Haczkiwicz et al. 2017, Rozenblut-Kościsty et al. 2017)。根据不同的染色质状态, 初级精母细胞可观察到 6 个阶段, 细线期、合线期、粗线期、双线期、终变期和中期阶段, 随后产生的次级卵母细胞经历第二次减数分裂成为精子细胞。精子细胞经历 4 个

阶段后成为圆型精子, 随后通过一系列形态变化, 最终形成精子, 由于生精囊的破裂, 精子进入生精小管管腔排出 (Manochantr et al. 2003)。

#### 4 卵巢发育和卵子发生

早期卵巢具有明显中央腔, 髓质细胞退化, 最终形成围绕在卵巢腔的单层上皮, 卵原细胞位于外周。卵巢的发育与细胞分裂紧密相关。在非洲爪蟾中, 初级卵原细胞在经历过 4 次有丝分裂后, 体细胞 (卵泡前细胞) 包围次级卵原细胞形成胞囊 (卵巢囊)。16 个次级卵原细胞由细胞间桥连接, 不同胞囊之间由环管相连。随后次级卵原细胞进入减数分裂, 成为卵母细胞, 标志着卵子形成开始 (Kloc et al. 2004, Sato et al. 2020)。当初级卵母细胞到达粗线期晚期时, 卵泡细胞穿透在初级卵母细胞之间, 并将其包围, 导致细胞失去连接, 卵巢囊破裂, 进



入初级卵泡阶段。卵巢囊内细胞发育是同步的，并且全部进入到卵巢囊到初级卵泡的转化过程中，没有细胞凋亡，而卵泡阶段的发育则是不同步的 (Konduktorova et al. 2013)。接下来一些初级卵母细胞进入双线期，并向卵巢中央移动，初级卵泡被基质包围成为次级卵泡。随着卵母细胞体积增大以及位置的移动，导致卵巢腔不断变小，最终消失 (Ogielska et al. 2004, Konduktorova et al. 2013)。卵母细胞在双线期长时间停滞，根据物种的不同，停滞时间也不同，期间卵母细胞不断生长。根据卵母细胞的大小以及卵黄含量，卵子发生可以分为 6 个时期 (Dumont 1972)，第 I ~ V 期主要发生转录以及卵黄形成，到第 VI 期，卵母细胞在一些类固醇激素的作用下重新进入减数分裂细胞周期，在第二次减数分裂中期再次停滞，最后在生殖季节重新启动并完成减数分裂，形成卵细胞 (Jesus et al. 2020, Sato et al. 2020)。

非洲爪蟾的原始生殖细胞 (PGCs) 是由母体生殖质所决定的，对于物种延续具有重要意义 (Aguero et al. 2017)。生殖质是一类特殊细胞质，主要由生殖颗粒、大量线粒体和其他细胞器构成。I 期卵母细胞，生殖质定位在巴尔比阿尼氏小体 (Balbiani body, Bb) 内，在 II ~ V 期卵母细胞中巴尔比阿尼氏小体向未来植物极方向移动构成细胞极性，并且最后碎裂。在第 VI 期卵母细胞时，生殖质聚集在植物极，最终生殖质不对称分配到受精卵卵裂细胞内，成为原始生殖细胞 (PGCs)。巴尔比阿尼氏小体是靠核细胞质区域的一个无膜结构，通过 Xvelo 蛋白进行淀粉样组装，能够聚合大量的 RNA、线粒体和其他细胞器 (Boke et al. 2016)。巴尔比阿尼氏小体不仅能够形成非洲爪蟾的细胞极性和生殖质 (Jamieson-Lucy et al. 2019)，同时这种无膜细胞器的维系，对于理解人类蛋白质聚集性疾病具有重要意义 (Shin et al. 2017)。

生殖质调控原始生殖细胞 (PGCs) 形成的分子机制尚未完全确定，但是引入微阵列

(Aguero et al. 2017)、高通量 RNA 测序 (Owens et al. 2017)、深度定量蛋白质组分析 (Sindelka et al. 2018) 和单细胞测序 (Onjiko et al. 2016) 等技术，将会使这一机制越发清晰。Owens 等 (2017) 对非洲爪蟾 VI 期卵母细胞的动物极和植物极 RNA 进行全面测序分析，分别鉴定出了 27 个和 411 个富集的 mRNA，并提出了植物极上的潜在路径，可能是未来研究的重要方向。不仅如此，研究发现非洲爪蟾与人类原始生殖细胞 (PGCs) 的转录产物有 80% 是保守的 (Butler et al. 2018)，这表明非洲爪蟾原始生殖细胞 (PGCs) 的相关研究对于阐明人类生殖特性方面具有借鉴作用。

## 5 小结与展望

无尾两栖动物的性腺发育具有一定的相似性，但不同物种之间在相关事件出现的时间，速率、类型以及一些特殊事件上表现出差异。

原始生殖细胞 (PGCs) 从诱导形成模式到母系决定形成模式的转变是通过不同的遗传和发育机制发生，可能涉及到物种的适应过程，目前还没有一个理想的假说模型来解释两种模式的关系。未来，可以扩大无尾两栖类生殖质决定原始生殖细胞 (PGCs) 形成的分子研究，关注生殖系基因组的突变率，以加深对脊椎动物原始生殖细胞 (PGCs) 形成模式的理解。

无尾两栖类的性腺分化由遗传决定，但由于性染色体的多样性，并受环境因子的影响，使得无尾两栖类性腺分化的分子机制尚不清楚。一方面可以在性腺分化前后使用新一代高通量基因测序技术，加快性别决定基因的鉴定，构建基因型性别决定模式的调控网络。另一方面，通过转录组学、蛋白组学和表观遗传学的研究来了解环境因素对性别决定的影响，以阐明基因型性别决定和环境型性别决定的关系。

无尾两栖类动物因其特殊的分类地位，使其性腺发育过程与其他物种都具有很大的相似性，因此我们认为需要将所研究课题置于生物进化的大背景下，参考其他模式动物的已有

研究, 应用现代高新技术, 才能更好地阐明性腺发育的科学问题。

## 参 考 文 献

- Abramyan J, Wilhelm D, Koopman P. 2010. Molecular characterization of the Bidder's organ in the cane toad (*Bufo marinus*). *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular & Developmental Evolution*, 314(6): 503–513.
- Aguero T, Kassmer S, Alberio R, et al. 2017. *Vertebrate Development: Maternal to Zygotic Control*. Cham: Springer, 383–440.
- Al-Mukhtar K A, Webb A C. 1971. An ultrastructural study of primordial germ cells, oogonia and early oocytes in *Xenopus laevis*. *Development*, 26(2): 195–217.
- Baronsky T, Dzementsei A, Oelkers M, et al. 2016. Reduction in E-cadherin expression fosters migration of *Xenopus laevis* primordial germ cells. *Integrative Biology*, 8(3): 349–358.
- Bartmańska J, Ogińska M. 1999. Development of testes and differentiation of germ cells in water frogs of the *Rana esculenta*-complex (Amphibia, Anura). *Amphibia-reptilia*, 20(3): 251–263.
- Bertocchini F, Chuva de Sousa Lopes S M. 2016. Germline development in amniotes: A paradigm shift in primordial germ cell specification. *BioEssays*, 38(8): 791–800.
- Boke E, Ruer M, Wühr M. 2016. Amyloid-like self-assembly of a cellular compartment. *Cell*, 166(3): 637–650.
- Bustos-Obregon E, Alliende C. 1973. Spermatogonial renewal in amphibian testis. I. Mitotic activity in the breeding season. *Archives of Biology (Bruxelles)*, 84: 329–339.
- Butler A M, Owens D A, Wang L. 2018. A novel role for *sox7* in *Xenopus* early primordial germ cell development: mining the PGC transcriptome. *Development*, 145(1): dev155978.
- Cavicchia J C, Moviglia G A. 1983. The blood–testis barrier in the toad (*Bufo arenarum* Hensel): A freeze - fracture and lanthanum tracer study. *The Anatomical Record*, 205(4): 387–396.
- Chavadej J, Jerareungrattana A, Sretarugsa P, et al. 2000. Structure and development of the testis of bullfrog *Rana catesbeiana*, and their changes during seasonal variation. *Science Asia*, 26(6): 69–80.
- Ciaramella V, Meccariello R, Chioccarelli T, et al. 2016. Anandamide acts via kisspeptin in the regulation of testicular activity of the frog, *Pelophylax esculentus*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 420: 75–84.
- Crother B I, White M E, Johnson A D. 2016. Diversification and germ-line determination revisited: Linking developmental mechanism with species richness. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 26(4): 1–8.
- De Felici M. 2016. *Molecular Mechanisms of Cell Differentiation in Gonad Development*. Cham: Springer, 23–46.
- De Oliveira C, Vicentini C A, Taboga S R. 2003. Structural characterization of nuclear phenotypes during *Scinax fuscovarius* spermatogenesis (Anura, Hylidae). *Caryologia*, 56(1): 75–83.
- De Oliveira C, Zanetoni C, Zieri R. 2002. Morphological observations on the testes of *Physalaemus cuvieri* (Amphibia, Anura). *Sociedad Chilena de Anatomía*, 20(3): 263–268.
- Dubois R. 1968. La colonisation des ébauches gonadiques par les cellules germinales de l'embryon de Poulet, en culture *in vitro*. *Development*, 20(2): 189–213.
- Dumont J N. 1972. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *Journal of Morphology*, 136(2): 153–179.
- Dzementsei A, Schneider D, Janshoff A, et al. 2013. Migratory and adhesive properties of *Xenopus laevis* primordial germ cells *in vitro*. *Biology open*, 2(12): 1279–1287.
- Eggert C. 2004. Sex determination: the amphibian models. *Reproduction Nutrition Development*, 44(6): 539–549.
- El-Jamil A, Magre S, Mazabraud A, et al. 2008. Early aspects of gonadal sex differentiation in *Xenopus tropicalis* with reference to an antero-posterior gradient. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 309(3): 127–137.
- Fabrezi M, Quinzio S I, Goldberg J. 2009. Giant tadpole and delayed metamorphosis of *Pseudis platensis* Gallardo, 1961 (Anura, Hylidae). *Journal of Herpetology*, 43(2): 228–243.
- Falconi R, Dalpiaz D, Zaccanti F. 2004. Ultrastructural aspects of gonadal morphogenesis in *Bufo bufo* (Amphibia Anura) I. Sex differentiation. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, 301(5): 378–388.
- Goldberg J. 2015. Gonadal differentiation and development in the

- snouted treefrog, *Scinax fuscovarius* (Amphibia, Anura, Hylidae). *Journal of Herpetology*, 49(3): 468–478.
- Gosner K L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 16(3): 183–190.
- Gramapurohit N, Shanbhag B, Saidapur S. 2000. Pattern of gonadal sex differentiation, development, and onset of steroidogenesis in the frog, *Rana curtipes*. *General and Comparative Endocrinology*, 119(3): 256–264.
- Grimaldi C, Raz E. 2020. Germ cell migration—Evolutionary issues and current understanding. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 100: 152–159.
- Griswold M D. 2016. Spermatogenesis: the commitment to meiosis. *Physiological Reviews*, 96(1): 1–17.
- Haczkiwicz K, Ogielska M. 2013. Gonadal sex differentiation in frogs: how testes become shorter than ovaries. *Zoological Science*, 30(2): 125–134.
- Haczkiwicz K, Rozenblut-Kościsty B, Ogielska M. 2017. Prespermatogenesis and early spermatogenesis in frogs. *Zoology*, 122: 63–79.
- Hayes T B. 1998. Sex determination and primary sex differentiation in amphibians: genetic and developmental mechanisms. *Journal of Experimental Zoology*, 281(5): 373–399.
- Hsü C Y, Liang H M. 1970. Sex races of *Rana catesbeiana* in Taiwan. *Herpetologica*, 26(2): 214–221.
- Jamieson-Lucy A, Mullins M C. 2019. The vertebrate Balbiani body, germ plasm, and oocyte polarity. *Current Topics in Developmental Biology*, 135: 1–34.
- Jessus C, Munro C, Houliston E. 2020. Managing the Oocyte Meiotic Arrest—Lessons from Frogs and Jellyfish. *Cells*, 9(5): 1150.
- Johnson A D, Alberio R. 2015. Primordial germ cells: the first cell lineage or the last cells standing? *Development*, 142(16): 2730–2739.
- Kalt M R. 1976. Morphology and kinetics of spermatogenesis in *Xenopus laevis*. *Journal of Experimental Zoology*, 195(3): 393–407.
- Kaptan E, Murathanoglu O. 2008. Annual morphological cycles of testis and thumb pad of the male frog (*Rana ridibunda*). *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 291(9): 1106–1114.
- Kloc M, Bilinski S, Dougherty M T, et al. 2004. Formation, architecture and polarity of female germline cyst in *Xenopus*. *Developmental Biology*, 266(1): 43–61.
- Konduktorova V, Luchinskaya N. 2013. Follicular cells of the amphibian ovary: Origin, structure, and functions. *Russian Journal of Developmental Biology*, 44(5): 232–244.
- Lambert M R M. 2018. Sex in the suburbs: The Genetic and Environmental Drivers of Sex Determination in Amphibians. New Haven: Yale University Doctoral Dissertation.
- Liu L S, Zhao L Y, Wang S H, et al. 2016. Research proceedings on amphibian model organisms. *Zoological Research*, 37(4): 237–245.
- Lopez K. 1989. Sex differentiation and early gonadal development in *Bombina orientalis* (Anura: Discoglossidae). *Journal of Morphology*, 199(3): 299–311.
- Mali P V, Gramapurohit N P. 2015. Pattern of gonadal differentiation and development up to sexual maturity in the frogs, *Microhyla ornata* and *Hylarana malabarica*: a comparative study. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 323(9): 666–678.
- Manochantr S, Sretarugsa P, Wanichanon C, et al. 2003. Classification of spermatogenic cells in *Rana tigerina* based on ultrastructure. *Science Asia*, 29(3): 241–254.
- Miura I. 2017. Sex determination and sex chromosomes in amphibia. *Sexual Development*, 11(5/6): 298–306.
- Nakamura M. 2009. Sex determination in amphibians. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20(3): 271–282.
- Nakamura M. 2010. The mechanism of sex determination in vertebrates—are sex steroids the key - factor? *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 313(7): 381–398.
- Nieuwkoop P D, Faber J. 1956. Normal Tables of *Xenopus laevis* (Daudin). Amsterdam: North-Holland.
- Ogielska M. 2009. Reproduction of Amphibians. Enfield: Science Publishers, 1–33.
- Ogielska M, Kotusz A. 2004. Pattern and rate of ovary differentiation with reference to somatic development in anuran amphibians. *Journal of Morphology*, 259(1): 41–54.

- Onjiko R M, Morris S E, Moody S A, et al. 2016. Single-cell mass spectrometry with multi-solvent extraction identifies metabolic differences between left and right blastomeres in the 8-cell frog (*Xenopus*) embryo. *Analyst*, 141(12): 3648–56.
- Owens D A, Butler A M, Aguero T H. 2017. High-throughput analysis reveals novel maternal germline RNAs crucial for primordial germ cell preservation and proper migration. *Development*, 144(2): 292–304.
- Pancharatna K, Kumbar S, Chandran S. 2000. Phalangeal growth marks related to testis development in the frog *Rana cyanophlyctis*. *Amphibia-reptilia*, 21(3): 371–379.
- Phuge S K, Gramapurohit N P. 2013. Gonadal sex differentiation, development up to sexual maturity and steroidogenesis in the skipper frog, *Euphlyctis cyanophlyctis*. *General and Comparative Endocrinology*, 181: 65–71.
- Pierantoni R, Cobellis G, Meccariello R, et al. 2002. The amphibian testis as model to study germ cell progression during spermatogenesis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 132(1): 131–139.
- Pinto-Eraza M A, Goldberg F J, Jerez A. 2016. Gonadal development in the Neotropical high Andean frog *Dendropsophus labialis* (Amphibia: Hylidae). *Cuadernos de Herpetología*, 30 (2): 57–68.
- Piprek R P, Kloc M, Kubiak J Z. 2014a. Bidder's organ – Structure, development and function. *The International Journal of Developmental Biology*, 58(10/11/12): 819–827.
- Piprek R P, Kloc M, Kubiak J Z. 2016. *Molecular Mechanisms of Cell Differentiation in Gonad Development*. Cham: Springer, 1–22.
- Piprek R P, Kloc M, Tassan J P, et al. 2017. Development of *Xenopus laevis* bipotential gonads into testis or ovary is driven by sex-specific cell-cell interactions, proliferation rate, cell migration and deposition of extracellular matrix. *Developmental Biology*, 432(2): 298–310.
- Piprek R P, Kubiak J Z. 2014b. *Xenopus Development*. New Jersey: John Wiley & Sons Inc, 199–214.
- Piprek R P, Pecio A, Laskowskakaszub K. 2013. Retinoic acid homeostasis regulates meiotic entry in developing anuran gonads and in Bidder's organ through Raldh2 and Cyp26b1 proteins. *Mechanisms of Development*, 130(11/12): 613–627.
- Piprek R P, Pecio A, Szymura J M. 2010. Differentiation and development of gonads in the yellow-bellied toad, *Bombina variegata* L., 1758 (Amphibia: Anura: Bombinatoridae). *Zoological Science*, 27(1): 47–55.
- Pudney J. 1995. Spermatogenesis in nonmammalian vertebrates. *Microscopy Research and Technique*, 32(6): 459–497.
- Rastogi R K, Bagnara J T, Iela L, et al. 1988. Reproduction in the Mexican leaf frog, *Pachymedusa dacnicolor*. IV. Spermatogenesis: a light and ultrasonic study. *Journal of Morphology*, 197(3): 277–302.
- Rastogi R, Iela L. 1980. *Steroids and Their Mechanism of Action in Nonmammalian Vertebrates*. New York: Raven Press, 131–146.
- Rastogi R, Meglio M D, Matteo L D, et al. 1985. Morphology and cell population kinetics of primary spermatogonia in the frog (*Rana esculenta*)(Amphibia: Anura). *Journal of Zoology*, 207(3): 319–330.
- Raz E. 2003. Primordial germ-cell development: the zebrafish perspective. *Nature Reviews Genetics*, 4(9): 690–700.
- Rodrigues N, Vuille Y, Loman J, et al. 2015. Sex-chromosome differentiation and 'sex races' in the common frog (*Rana temporaria*). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1806): 20142726.
- Rozenblut-Kościsty B, Piprek R, Pecio A, et al. 2017. The structure of spermatogenic cysts and number of Sertoli cells in the testes of *Bombina bombina* and *Bombina variegata* (Bombinatoridae, Anura, Amphibia). *Zoomorphology*, 136(4): 483–495.
- Sassone A G, Regueira E, Scaia M F. 2015. Development and steroidogenic properties of the Bidder's organ of the tadpole of *Rhinella arenarum* (Amphibia, Anura). *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 323(3): 137–145.
- Sato K, Tokmakov A A. 2020. Toward the understanding of biology of oocyte life cycle in *Xenopus laevis*: No oocytes left behind. *Reproductive Medicine and Biology*, 19(2): 114–119.
- Shin Y, Brangwynne C P. 2017. Liquid phase condensation in cell physiology and disease. *Science*, 357(6357): 1253–1253.
- Sindelka R, Abaffy P, Qu Y. 2018. Asymmetric distribution of biomolecules of maternal origin in the *Xenopus laevis* egg and their impact on the developmental plan. *Scientific Reports*, 8(1):

- 1–16.
- Takamune K, Kawasaki T, Ukon S. 2001. The first and the second mitotic phases of spermatogonial stage in *Xenopus laevis*: secondary spermatogonia which have differentiated after completion of the first mitotic phase acquire an ability of mitosis to meiosis conversion. *Zoological Science*, 18(4): 577–583.
- Takeuchi T, Tanigawa Y, Minamide R, et al. 2010. Analysis of SDF-1/CXCR4 signaling in primordial germ cell migration and survival or differentiation in *Xenopus laevis*. *Mechanisms of Development*, 127(1/2): 146–158.
- Tandon P, Conlon F, Furlow J D, et al. 2017. Expanding the genetic toolkit in *Xenopus*: approaches and opportunities for human disease modeling. *Developmental Biology*, 426(2): 325–335.
- Tanimura A, Iwasawa H. 1988. Ultrastructural observations on the origin and differentiation of somatic cells during gonadal development in the Frog *Rana nigromaculata*. *Development Growth & Differentiation*, 30(6): 681–691.
- Tanimura A, Iwasawa H. 1989. Origin of somatic cells and histogenesis in the primordial gonad of the Japanese tree frog *Rhacophorus arboreus*. *Anatomy and Embryology*, 180(2): 165–173.
- Tarbashevich K, Dzementsei A, Pieler T. 2011. A novel function for KIF13B in germ cell migration. *Developmental Biology*, 349(2): 169–178.
- Tarbashevich K, Koebnick K, Pieler T. 2007. XGRIP2.1 is encoded by a vegetally localizing, maternal mRNA and functions in germ cell development and anteroposterior PGC positioning in *Xenopus laevis*. *Developmental Biology*, 311(2): 554–565.
- Whittle C A, Extavour C G. 2016. Refuting the hypothesis that the acquisition of germ plasm accelerates animal evolution. *Nature Communications*, 7(1): 1–11.
- Witschi E. 1929. Studies on sex differentiation and sex determination in amphibians. III. Rudimentary hermaphroditism and Y chromosome in *Rana temporaria*. *Journal of Experimental Zoology*, 54(2): 157–223.
- Wylie C, Bancroft M, Heasman J. 1976. The formation of the gonadal ridge in *Xenopus laevis*: II. A scanning electron microscope study. *Development*, 35(1): 139–148.
- Yoshida S. 2016. From cyst to tubule: innovations in vertebrate spermatogenesis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 5(1): 119–131.
- 陈伟庭, 李东风. 2008. 中国林蛙胚胎期性腺发育的组织学观察. *华南师范大学学报: 自然科学版*, 40(1): 36–41.
- 李桑. 2008. 泽蛙的性腺分化及温度对性别决定的影响. 福建: 福建师范大学硕士学位论文.
- 李新红, 赵文阁, 郭玉民, 等. 2001. 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*, 2(5): 351–356.
- 马玲, 陆宇燕. 2011. 花背蟾蜍性腺分化的组织学观察. *沈阳师范大学学报: 自然科学版*, 29(2): 288–292.
- 梅玮芸, 郑荣泉, 郑善坚, 等. 2018. 棘胸蛙的性腺分化及温度对其性别决定的影响. *生态学报*, 38(13): 4809–4716.
- 张天荫. 1987. 无尾两栖类的原生生殖细胞. *细胞生物学杂志*, 9(4): 145–149.