

不同孵化湿度下的乌龟卵孵化成功率 及新生幼体特征*

杜卫国^{1**} 郑荣泉²

1. 杭州师范学院生命科学学院, 杭州 310036
2. 浙江师范大学环境和生命科学学院, 金华 321004

Egg survival and hatchling traits of the Chinese three-keeled pond turtle *Chinemys reevesii* incubated in different hydric environments*

DU Wei-Guo^{1**}, ZHENG Rong-Quan²

1. School of Life sciences, Hangzhou Normal College, Hangzhou 310036, Zhejiang, China
2. College of Life and Environmental Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, Zhejiang, China

Abstract A total of 51 Chinese three-keeled pond turtle *Chinemys reevesii* eggs were incubated on wet and dry substrates (water potentials of -12 kPa and -300 kPa, respectively) at 30 °C to assess the influence of the hydric environments on egg survival and hatchling traits. Eggs incubated in the dry condition lost weight, whereas those incubated in the wet condition did not. The hydric environments did not affect incubation lengths (60.3 vs 60.7 days) as well as hatching success (69.2% vs 88.0%). Except for wet body mass and carapace width, which were larger for hatchlings from the -12 kPa treatment than from the -300 kPa treatment, the hydric environments did not affect most hatchling traits. These unaffected traits included dry body mass, carapace length, tail length, limb length, hatchling components (carcass, residual yolk and fat bodies), swimming performance and critical thermal minimum. In conclusion, within the waterpotential of -12 to -300 kPa, hydric environments have little effect on embryonic development and hatchling traits in Chinese three-keeled pond turtles [*Acta Zoologica Sinica* 50 (1): 133-136, 2004].

Key words Chinese three-keeled pond turtle, *Chinemys reevesii*, Water potential, Incubation, Egg, Hatchling, Phenotypic trait

关键词 乌龟 湿度 孵化 卵 幼体表型特征

湿度是影响龟鳖动物卵孵化的重要环境因子之一 (Congdon and Gibbons, 1990; Packard, 1999)。实验室研究表明湿度可影响孵化成功率 (Packard et al., 1989; Packard, 1991)、幼体形态 (Packard, 1999) 和运动表现 (Miller, 1993; Finkler et al., 2000)。野外实验也证明巢内湿度能显著影响龟鳖动物的胚胎发育和存活 (Cagle et al., 1993)。龟鳖类柔性卵与环境间水分交换活跃, 较湿环境条件下孵出发育完善且运动能力较强的幼体 (Packard, 1991, 1999; Miller, 1993)。而刚性卵与环境的水分交换较少, 湿度对其胚胎和幼体的作用小 (Packard, 1999; Booth, 2002)。然而, 已有研究主要以柔性卵为对象, 对刚性卵涉及较少。国内

对龟鳖动物卵孵化的研究主要集中于环境温度的作用 (王培潮等, 1990; 杜卫国、计翔, 2001a; Du and Ji, 2003)。本研究以产刚性卵的乌龟 (*Chinemys reevesii*) 为对象, 在不同湿度条件下孵化乌龟卵, 旨在检测孵化湿度对胚胎存活以及新生幼体形态、运动能力和低温耐受性的影响。

1 材料和方法

实验用 51 枚龟卵于 2001 年 7 月购自上海。所有卵均于产出当日收集, 经可孵性鉴别 (有无白斑)、称重、测量和编号后, 移入内含孵化基质的塑料盒中。卵的 1/2 埋入基质, 白斑朝上。基质湿度设置为 -300 kPa 和 -12 kPa, 分别由干蛭石

2003-06-09 收稿, 2003-08-24 修回

* 杭州市新世纪人才基金资助 (This research was funded by Hangzhou Municipal Found for New-century Talents)

** 通讯作者 (Corresponding author). E-mail: duweigu@mail.hz.zj.cn

© 2004 动物学报 *Acta Zoologica Sinica*

(Vermiculite) 水 = 1 0.44 和 1 2 配成。孵化盒用穿孔的塑料薄膜覆盖, 放置于 30 ± 0.3 的生化培养箱 (广东医疗器械厂)。每日补充水分以保持湿度恒定。

在孵化过程中, 每隔 5 天称卵重。孵化期为卵入孵时间至幼体破壳时间的间隔, 幼体孵出 1 h 内即被收集、称重, 然后在 1 m 长的直形泳道内测定其游泳能力。实验均在 30 ± 0.5 的恒温室内进行。预先将动物置于恒温室内适应 1 h, 测定游泳能力时, 刺激动物尾部, 以 Panasonic NV-MX3 数码摄像机记录动物的运动过程, 随后用 Ulead video studio 5.0 软件分析行为录像, 测定最大瞬时游泳速度和 800 mm 距离游泳时间。测定运动行为后的第二天, 测定动物对低温的耐受性, 方法同 Du et al. (2000)。随后将幼体冰冻处死, 解剖分离为躯干、剩余卵黄和脂肪体。幼体三组分在 65 烘箱中干燥至恒重后, 称得干重, 用 WGR-1 型弹式热量计 (长沙仪器厂) 测定其能量。

所有数据在做进一步统计分析前, 用 Kolmogorov-Smirnov 和 Bartlett 分别检验正态性和方差的同质性。用 G 检验比较不同湿度条件下的孵化成功率。用线性相关、方差分析 (ANOVA) 和协方差分析 (ANCOVA) 处理和比较满足参数假设条件的数据, 比较矫正平均值前, 检验斜率的均一性。描述性统计值用平均值 \pm 标准误表示。

2 结果

两种湿度条件下乌龟卵的初始重量无显著差异 ($F_{1,38} = 0.06$, $P = 0.81$)。在 -12 kPa 条件下, 卵终末重量与初始重量无显著差异 ($F_{1,59} = 2.32$, $P = 0.13$); 在 -300 kPa 条件下, 卵则持续减重 ($F_{11,192} = 12.38$, $P < 0.0001$) (图 1)。因此, -300 kPa 条件下卵终末重量显著小于 -12 kPa 条件下的卵 ($F_{1,38} = 83.79$, $P < 0.0001$)。

乌龟孵化期与卵初始重量无关 ($F_{1,38} = 1.53$, $P = 0.22$)。孵化湿度不影响乌龟卵孵化期 ($F_{1,38} = 0.13$, $P = 0.72$), 也不影响其孵化成功率 ($G = 0.57$, $df = 1$, $P > 0.05$) (表 1)。

湿度显著影响新生幼体的湿重及背甲宽, -300 kPa 条件下幼体的湿重和背甲宽显著小于 -12 kPa 条件下的幼体。但新生幼体的干重、背甲长、尾长及附肢长无明显差异 (表 2)。

在测定游泳能力过程中, 13.6% (3/22) 的 -12 kPa 新生幼体和 27.8% (5/18) -300 kPa 新

生幼体在泳道上静止不动。随后的统计分析中未包括这些个体。动物的游泳能力与个体大小无显著相

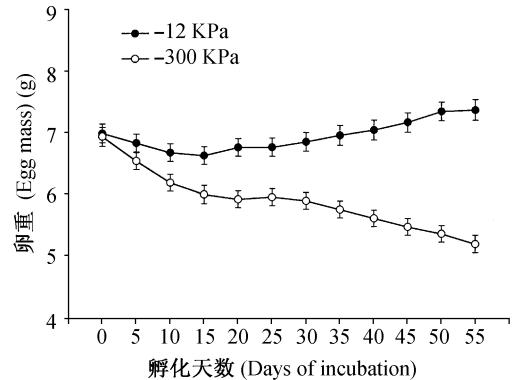


图 1 不同孵化湿度条件下乌龟卵重量的动态变化

Fig. 1 Dynamic variations in egg mass during the development of *Chinemys reevesii* embryo incubated in different hydric environments

表 1 不同湿度条件下乌龟卵的孵化期和孵化成功率

Table 1 Incubation length and hatching success of eggs incubated at different hydric environments in the *Chinemys reevesii*

湿度 Moisture	入孵卵 Incubated eggs	孵化期 Incubation length (day)	孵化成功率 Hatching success (%)
- 12 kPa	25	60.7 \pm 0.6 (56.4 - 67.3)	88.0 (22/25)
- 300 kPa	26	60.3 \pm 1.0 (56.4 - 75.6)	69.2 (18/26)

关性 (所有 $P > 0.05$), 因此, 用方差分析比较 -12 kPa 和 -300 kPa 条件下幼体的游泳能力, 结果显示幼体游完 800 mm 所需时间及最大游泳速度无显著差异 (时间: 16.7 ± 1.9 s vs 17.0 ± 1.7 s, $F_{1,30} = 0.02$, $P = 0.90$; 最大速度: 87.34 ± 7.26 m/s vs 88.1 ± 8.7 m/s, $F_{1,30} = 0.01$, $P = 0.95$)。

-12 kPa 条件下新生幼体的下临界温度为 2.10 ± 0.09 ($n = 22$), 范围为 1.50 - 3.10; -300 kPa 条件下新生幼体的下临界温度为 2.20 ± 0.12 ($n = 17$), 范围为 1.70 - 3.80。两者之间无显著差异 (ANOVA, $F_{1,37} = 2.22$, $P = 0.14$)。

新生幼体躯干、剩余卵黄和脂肪体的能量与初始卵重呈显著正相关 (所有 $P < 0.05$), 以初始卵重为协变量的协方差分析表明, 孵化湿度对幼体躯干 ($F_{1,36} = 0.01$, $P = 0.94$)、剩余卵黄 ($F_{1,36} = 1.72$, $P = 0.20$) 和脂肪体 ($F_{1,36} = 0.02$, $P = 0.89$) 的能量含量无显著影响。

表 2 孵化湿度对乌龟新生幼体体重及形态特征的影响
Table 2 Effects of incubation water potential on body mass and morphology of *Chinemys reevesii* hatchlings

湿度 Moisture	- 12 kPa	- 300 kPa	ANCOVA
样本数 Sample size	22	18	
幼体湿重 Wet body mass (g)	4.242 ^a ± 0.074	3.891 ^b ± 0.084	$F_{1,37} = 9.38$ $P < 0.01$
幼体干重 Dry body mass (g)	0.964 ± 0.032	0.978 ± 0.029	$F_{1,37} = 0.12$ $P = 0.73$
背甲长 Carapace length (mm)	24.75 ± 0.21	24.33 ± 0.18	$F_{1,37} = 2.13$ $P = 0.15$
背甲宽 Carapace width (mm)	20.00 ^a ± 0.19	19.60 ^b ± 0.15	$F_{1,37} = 7.02$ $P < 0.01$
尾长 Tail length (mm)	18.75 ± 0.22	18.33 ± 0.34	$F_{1,37} = 2.50$ $P = 0.12$
前肢长 Fore limb length (mm)	14.22 ± 0.14	14.35 ± 0.13	$F_{1,37} = 0.08$ $P = 0.78$
后肢长 Hind limb length (mm)	15.42 ± 0.16	15.37 ± 0.16	$F_{1,37} = 0.02$ $P = 0.89$

数据用矫正平均值 ± 标准误表示，协变量初始卵重设置为 7.052 g。每行中不同上标的矫正平均值之间差异显著（Tukey 检验）（Data are expressed as adjusted mean ± SE. Initial mass of egg was set at 7.052 g as the covariate. Adjusted means with different superscripts on each line are statistically different, Tukey's test.）

3 讨论

孵化湿度对龟鳖动物卵重量的影响决定于卵壳的无机物含量和形态结构。柔性卵从潮湿环境中吸收水分供胚胎发育所需，在孵化过程中增重明显（Thompson, 1987）。与柔性卵不同，乌龟产刚性卵（卵壳无机物含量 51.0%），在潮湿基质中，其刚性卵壳限制吸水膨胀，增重不显著。但在干燥基质中，乌龟刚性卵内水分向外散失，导致明显的失重（图 1）。这与其他一些刚性卵研究的结果相似（Gutzke et al., 1987; Congdon and Gibbons, 1990; Packard, 1999; 杜卫国等, 2001b）。因此，在孵化

过程中，刚性卵重量在潮湿基质中变化不显著，在干燥条件下则下降。

本研究设置的孵化湿度对乌龟卵孵化期和孵化成功率无显著影响（表 1）。已有研究也表明，刚性卵孵化期和孵化成功率在较大湿度范围内（- 50 kPa 到 - 850 kPa）无显著差异（Packard, 1999; Booth, 2002）。对柔性卵而言，在 0 到 - 220 kPa 的湿度范围内，孵化湿度对其孵化成功率无显著影响（Ji and Du, 2001a, b; 张永普、计翔, 2002），但是，极端干燥条件下卵的孵化成功率则显著下降，如 - 1100 kPa 条件下的锦龟（*Chrysemys picta*）（Packard et al., 1989）。因此，在较大范围内，湿度对爬行动物卵孵化期和孵化成功率的影响不显著。

与已有报道（Packard, 1999; Booth, 2002）相似，孵化湿度对乌龟新生幼体形态影响较小，仅表现为幼体湿重和背甲宽的差异（表 2）。由于幼体干重无显著差异，因此，幼体湿重的差异主要为体内水分差异所致，潮湿条件下孵出的幼体比干燥条件下新生幼体含有较多水分。与刚性卵不同，柔性卵新生幼体特征变异与湿度大小有关。在 0 到 - 220 kPa 范围内，湿度对新生幼体形态影响不显著（Ji and Du, 2001a, b），而在更大湿度范围内（- 150 到 - 1100 kPa），潮湿环境下新生幼体常具有较大的躯干和较小的剩余卵黄（Packard, 1999）。

孵化湿度对刚性卵内新生幼体功能表现的作用尚未见报道，本文结果显示，孵化湿度对乌龟幼体的运动能力和低温耐受性均无显著影响。然而，孵化湿度能影响柔性卵内孵出幼体的运动能力，潮湿环境中新生幼体的运动能力显著高于干燥环境（Miller, 1993; Finkler et al., 2000）。

综上所述，在 - 12 到 - 300 kPa 范围内，孵化湿度对乌龟胚胎发育、幼体形态和功能表现的作用微弱。因此，本文结果支持孵化湿度对刚性卵孵化影响较小的观点。

致谢 寿鹿、金盛扬等参与部分工作，谨表谢意。

参考文献 (References)

- Booth DT, 2002. Incubation of rigid-shelled eggs: do hydric conditions matter? J. Comp. Physiol. 172B: 627 - 633.
Cagle KD, Packard KM, Packard MJ, 1993. Effects of the microcli-

- mate in natural nests on development of embryonic painted turtles, *Chrysemys picta*. *Funct. Ecol.* 7: 653 - 660.
- Congdon JD, Gibbons JW, 1990. Turtle eggs: their ecology and evolution. In: Gibbons JW, ed. *Life History and Ecology of the Slider Turtle*. Washington, DC: Smithsonian Institution Press, 109 - 123.
- Du WG, Ji X, 2001a. Influence of incubation temperature on embryonic use of material and energy in the Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*). *Acta Zool. Sin.* 47 (5): 512 - 517 (In Chinese).
- Du WG, Ji X, 2003. The effects of thermal environments on size, locomotor performance and early growth of hatchling soft-shelled turtles, *Pelodiscus sinensis*. *J. Therm. Biol.* 28: 279 - 286.
- Du WG, Ji X, Xu WQ, 2001b. Dynamics of material and energy during incubation in the soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*). *Acta Zool. Sin.* 47 (4): 371 - 375 (In Chinese).
- Du WG, Yan SJ, Ji X, 2000. Selected body temperature, thermal tolerance and thermal dependence of food assimilation and locomotor performance in adult blue-tailed skinks, *Eumeces elegans*. *J. Therm. Biol.* 25: 197 - 202.
- Finkler MS, Knickerbocker DL, Claussen DL, 2000. Influence of hydric conditions during incubation and population on overland movement of neonatal snapping turtles. *J. Herpetol.* 34: 452 - 455.
- Gutzke WHN, Packard GC, Packard MJ, Boardman TJ, 1987. Influence of the hydric and thermal environments on eggs and hatchlings of painted turtles (*Chrysemys picta*). *Herpetologica* 43: 393 - 404.
- Ji X, Du WG, 2001a. Effects of thermal and hydric environments on incubating eggs and hatchling traits in the cobra, *Naja Naja atra*. *J. Herpetol.* 35: 186 - 194.
- Ji X, Du WG, 2001b. The effects of thermal and hydric environments on hatching success, embryonic use of energy and hatchling traits in a colubrid snake, *Elaphe carinata*. *Comp. Biochem. Physiol.* 129A: 461 - 471.
- Millar K, 1993. The improved performance of snapping turtles (*Chelydra serpentina*) hatched from eggs incubated on a wet substrate persists through the neonatal period. *J. Herpetol.* 127: 233 - 236.
- Packard GC, 1991. Physiological and ecological importance of water to embryos of oviparous reptiles. In: Deeming DC, Ferguson MWJ, ed. *Egg Incubation: Its Effects on Embryonic Development in Birds and Reptiles*. Cambridge: Cambridge University Press, 213 - 228.
- Packard GC, 1999. Water relations of chelonian eggs and embryos: is wetter better? *Am. Zool.* 39: 289 - 303.
- Packard GC, Packard MJ, Birchard GF, 1989. Sexual differentiation and hatching success by painted turtles incubating in different thermal and hydric environments. *Herpetologica* 45: 385 - 392.
- Thompson MB, 1987. Water exchange in reptilian eggs. *Physiol. Zool.* 60: 1 - 8.
- Wang PC, Ma W, Lu B, You WH, 1990. Studies on ecology of incubation of eggs of *Chinemys reevesii*. *Herpetol. Series* 1: 113 - 119 (In Chinese).
- Zhang YP, Ji X, 2002. Further studies on egg incubation of an oviparous snake, *Dinodon rufozonatum* (Colubridae), with comments on the influence of hydric environments. *Acta Zool. Sin.* 48 (1): 35 - 43 (In Chinese).
- 杜卫国, 计翔, 徐梓卿, 2001. 中华鳖卵孵化过程中物质和能量的动态变化. *动物学报* 47 (4): 371 - 375.
- 杜卫国, 计翔, 2001. 孵化温度对中华鳖胚胎物质和能量利用的影响. *动物学报* 47 (5): 512 - 517.
- 王培潮, 马伟, 卢波, 由文辉, 1990. 乌龟卵孵化生态的研究. *蛇蛙研究丛书* 1: 113 - 119.
- 张永普, 计翔, 2002. 火赤链游蛇卵孵化的进一步研究兼评孵化水环境的影响. *动物学报*, 48 (1): 35 - 43.