

Effects of Different Temperature on Hatching and hatchling Traits of Turtle *Mauremys reevesii*

Mengni Li, Chenghao Wang, Zhenyi Bao, Chenkun Huang, Jianyu Jin*

School of Education, Wenzhou University, Wenzhou Zhejiang
Email: *jjy@wzu.edu.cn

Received: Jul. 26th, 2019; accepted: Aug. 9th, 2019; published: Aug. 16th, 2019

Abstract

Incubation temperature affects the embryo hatching and hatchling traits of egg-laying reptiles. Respectively, eggs of the Chinese three-keeled pond turtle (*Mauremys reevesii*) were incubated at $26 \pm 0.5^\circ\text{C}$, $29 \pm 0.5^\circ\text{C}$ and $31 \pm 0.5^\circ\text{C}$, and shifted between 26°C and 31°C to test the effects of temperature on the hatching process and hatchling traits in the temperature-sensitive period (TSP) (in Stage 15, 18 and 21) of embryonic development. The results showed that the hatching temperature significantly affected the hatching period of turtle eggs and hatchling traits. The 15th stage in the early TSP stage may also be an important period when embryonic development is affected by temperature.

Keywords

Temperature, Temperature Displacement, *Mauremys reevesii*, Incubation, Hatchling

不同温度对乌龟卵孵化和幼体性状的影响

厉梦妮, 王程昊, 鲍珍怡, 黄晨坤, 金建钰*

温州大学教育学院, 浙江 温州
Email: *jjy@wzu.edu.cn

收稿日期: 2019年7月26日; 录用日期: 2019年8月9日; 发布日期: 2019年8月16日

摘要

孵化温度影响卵生爬行动物的胚胎孵化和幼体特征。本研究分别设定三个孵化温度($26 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 、 $(29 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 、

*通讯作者。

(31 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 来孵化乌龟(*Mauremys reevesii*)卵,并于胚胎发育的温度敏感期(Temperature-Sensitive Period, TSP)内(第15、18和21期)进行26 $^{\circ}\text{C}$ 和31 $^{\circ}\text{C}$ 之间的温度置换实验,检测不同的温度条件对孵化过程和幼体性状的影响。实验结果表明,孵化温度显著影响乌龟卵的孵化期和幼体性状;处于TSP早期的第15期可能也是胚胎发育受温度影响的重要时期。

关键词

温度, 温度置换, 乌龟, 孵化, 幼体

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

外界环境对卵生爬行动物的胚胎发育影响极大,温度是其中一个重要的环境因子[1]。对乌龟而言,胚胎期的孵化温度可显著影响卵的孵化期、孵化率、孵出幼体表型特征和功能特征等[2] [3] [4] [5]。温度依赖性性别决定型(Temperature-Dependent Sex Determination, TSD)爬行动物幼体性别受到孵化温度的影响[6] [7],胚胎性别分化的关键期主要集中在温度敏感期(TSP) [8]。乌龟属于TSD Ia型,即低温孵出后代以雄性为主,高温孵出以雌性为主[4]。迄今为止,有关温度对龟鳖动物胚胎发育影响的研究主要侧重于性别分化的现象与机理研究[4] [9] [10] [11] [12],在进行温度置换实验(Temperature-Shift Experiment)时候往往忽略了温度置换对胚胎TSP其他性状的影响。同时,由于全球气候变暖,环境温度变动加剧,孵化过程中孵化温度在胚胎不同发育期的改变将影响到胚胎发育和孵出幼体的性状。

乌龟在中国野外曾经广泛分布,但是由于生态环境的恶化及人为过度的捕捉,乌龟的野生自然资源日益枯竭。同时,在国内外食用、药用和宠物市场的迫切需求下,乌龟的人工养殖却在日趋兴旺。因此,开展温度对乌龟卵孵化和幼体性状的影响研究,不仅能拓展温度对爬行动物胚胎发育影响的认识,而且可以为乌龟的生产养殖提供一定的参考作用。

2. 材料与方法

2.1. 实验材料

实验用乌龟卵购自浙江省海宁龙头阁龟鳖养殖场,均为产出24小时后的受精卵,中部白斑明显。

2.2. 人工孵化

共设置3个恒定的孵化温度:(26 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$ (产雄温度)、(29 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 、(31 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$ (产雌温度)和6个温度置换试验[11],每个温度下入孵龟卵15枚。在胚胎发育第15、18和21期(分别对应TSP早、中和后期)分别将15枚龟卵从雄性产生温度(26 $^{\circ}\text{C}$)下置换到雌性产生温度(31 $^{\circ}\text{C}$) (温度置换实验组I-III),或者将龟卵从31 $^{\circ}\text{C}$ 置换到26 $^{\circ}\text{C}$ (温度置换实验组IV-VI)。将卵白斑朝上半埋于内含潮湿基质(-220 kPa,干蛭石:水=1:1)的孵化盒中。孵化盒分别置于设定温度为26 $^{\circ}\text{C}$ 、29 $^{\circ}\text{C}$ 和31 $^{\circ}\text{C}$ 的人工气候箱(宁波莱福科技有限公司),每隔三天补充孵化基质散失的水分,以保持盒内湿度恒定。孵化过程中每周按顺序调整培养箱中的孵化盒位置,以减少箱内温度梯度的可能影响。恒温组同时孵入多余的备用蛋,每隔两天剖蛋观察,以确定乌龟胚胎发育期[13] [14]。

2.3. 幼体性状的测定

孵化期为卵入孵时间至幼体破壳时间的间隔。待幼体即将破壳，每天检查孵化盒 3 次。一旦幼体孵出，立即收集新生幼体测定其体重，两天后测其背甲长、宽和高。

2.4. 数据统计

采用 Excel 2013 和 SPSS 19.0 软件对实验所得数据进行统计与处理。应用单因素方差分析(One-Way ANOVA)检验温度对孵化期的影响；以初始卵重为协变量，温度为因子，用协方差分析(ANCOVA)检验温度对稚龟形态特征(稚龟质量、背甲长、背甲宽、体高)的影响。描述性统计值用平均值 \pm 标准误表示，显著性水平设置为 $\alpha = 0.05$ 。

3. 结果

3.1. 温度对孵化期的影响

从总体上来看，温度显著影响幼体的孵化期($F_{8,89} = 50.863, P < 0.001$) (见表 1)。在 26℃~31℃ 范围内，胚胎发育速度随孵化温度的升高而加快。其中，温度置换实验 I、II、III 与 26℃ 相比，孵化期存在显著差异($P < 0.001$)，且胚胎发育速率均增快(见表 1)。温度置换实验 I 的发育速率最快，表明在乌龟胚胎发育第 15 期提高温度，对其孵化期影响最大。同时，温度置换实验 I 与温度置换实验 II 相比无显著差异，但是与温度置换实验 III 相比存在显著差异($P < 0.001$)。温度置换实验 V、VI 与 31℃ 相比，孵化期差异均不显著($P > 0.05$)，表明在胚胎发育第 18 期、第 21 期适当降低温度，不会对孵化期造成显著影响。但是，温度置换实验 IV 与 31℃ 间存在显著差异($P < 0.001$)，表明在乌龟胚胎发育第 15 期降低温度，会对乌龟胚胎发育造成显著影响，延长孵化期。综上所述，从 TSP 的三个时期来看，温度变化对乌龟胚胎发育第 15 期影响最大。

Table 1. Hatching time and development rate of turtle eggs under different temperatures

表 1. 不同温度下龟卵孵化时间和发育速率

温度(℃)	孵卵数(个)	孵出稚龟数(个)	孵化时间(d)	发育速率
26℃	15	11	81.17 \pm 1.63 ^a	0.0123
29℃	15	12	65.78 \pm 0.83 ^{de}	0.0152
31℃	15	11	61.52 \pm 0.81 ^f	0.0163
温度转换实验 I	15	11	69.90 \pm 0.69 ^{cd}	0.0143
温度转换实验 II	15	14	71.67 \pm 0.42 ^{bc}	0.0140
温度转换实验 III	15	8	75.42 \pm 1.73 ^b	0.0133
温度转换实验 IV	15	11	69.07 \pm 0.77 ^{cd}	0.0145
温度转换实验 V	15	10	63.16 \pm 0.82 ^{ef}	0.0158
温度转换实验 VI	15	10	60.00 \pm 0.57 ^f	0.0167

注：发育速率即孵化时间的倒数；同一列具有相同的角标字母为差异不显著，不同为差异显著。

3.2. 孵化温度对稚龟形态特征的影响

以初始卵重为协变量，温度为因子，协方差分析检验表明：在 26℃~31℃ 范围内，随着孵化温度的增加，稚龟重量、背甲长、背甲宽、体高均有所减少(见表 2)。孵化温度对稚龟重量($F_{8,88} = 3.774, P < 0.01$)、

背甲长($F_{8,88} = 3.987$, $P < 0.001$)、背甲宽($F_{8,88} = 3.172$, $P < 0.01$)、体高($F_{8,88} = 5.438$, $P < 0.001$)均有显著影响,处于 26℃和 31℃下的孵出稚龟重量存在显著差异($P < 0.05$)。乌龟卵一直处于 26℃孵化与分别在第 15 期、第 18 期、第 21 期挪入 31℃相比,稚龟重量、背甲长、背甲宽、体高较高,且均有显著差异($P < 0.05$)。但是,温度置换的不同组别之间不存在显著差异。乌龟卵一直处于 31℃孵化与第 15 期挪入 26℃相比,稚龟重量较轻,且有显著差异($P < 0.05$),其他时期挪入不会产生显著影响。综上所述,TSP 中的温度置换仍然会对稚龟的形态特征产生影响。

Table 2. Morphological indices of hatchling turtles at different incubation temperatures

表 2. 不同孵化温度孵出稚龟的形态指标

温度(℃)	初始卵重(g)	稚龟重量(g)	背甲长(mm)	背甲宽(mm)	体高(mm)
26℃	10.12 ± 0.24	6.60 ± 0.15 ^a	29.36 ± 0.37 ^a	23.97 ± 0.27 ^{ab}	16.15 ± 0.17 ^a
29℃	9.57 ± 0.22	6.07 ± 0.11 ^b	28.84 ± 0.23 ^a	23.18 ± 0.22 ^{abcd}	15.30 ± 0.16 ^b
31℃	10.06 ± 0.25	6.13 ± 0.18 ^b	28.96 ± 0.40 ^a	23.68 ± 0.30 ^{bc}	15.66 ± 0.25 ^{ab}
温度转换实验 I	9.13 ± 0.29	5.57 ± 0.15 ^b	26.96 ± 0.36 ^c	22.21 ± 0.58 ^d	14.63 ± 0.21 ^{cd}
温度转换实验 II	9.16 ± 0.26	5.65 ± 0.14 ^b	27.37 ± 0.36 ^{bc}	22.15 ± 0.31 ^d	14.56 ± 0.18 ^d
温度转换实验 III	9.47 ± 0.33	5.75 ± 0.19 ^b	27.66 ± 0.52 ^{bc}	22.61 ± 0.40 ^{cd}	15.01 ± 0.22 ^{bcd}
温度转换实验 IV	9.44 ± 0.26	6.18 ± 0.15 ^a	28.42 ± 0.47 ^{ab}	22.86 ± 0.39 ^{bcd}	15.16 ± 0.20 ^{bc}
温度转换实验 V	10.23 ± 0.38	6.50 ± 0.19 ^a	29.37 ± 0.41 ^a	24.30 ± 0.25 ^a	16.04 ± 0.20 ^a
温度转换实验 VI	9.48 ± 0.20	6.05 ± 0.20 ^b	29.05 ± 0.33 ^a	23.73 ± 0.29 ^{ab}	15.54 ± 0.20 ^{ab}

注:同一列具有相同的角标字母为差异不显著,不同为差异显著。

4. 讨论

4.1. 孵化温度对乌龟卵孵化的影响

孵化温度对爬行动物的胚胎发育过程起着极其重要的影响。前人研究发现,孵化温度显著影响乌龟胚胎的能量利用,在 27℃~30℃可提高胚胎能量转化效率,促进胚胎从卵黄和卵壳中吸收较多的矿物质,有利于孵出发育良好的幼体[3]。在一定温度范围内,胚胎的发育速度随着孵化温度的升高而加快,孵化期也随之缩短[10]。从本实验的结果来看,从 26℃~31℃,胚胎发育明显加快,孵化期变短,与已有研究相符[4]。

当龟卵从 26℃置换到 31℃,不管在 TSP 哪个发育期,胚胎发育均加快;乌龟胚胎发育第 15 期提高温度,对其孵化期影响最大。同时,只有在胚胎发育第 15 期将龟卵从 31℃置换到 26℃才会对孵化期造成显著影响,表明这时候的降温会对乌龟胚胎发育造成显著影响,延长孵化期。以上情况说明,TSP 不仅是性别分化的敏感期,其早期可能也是胚胎发育受温度影响的重要期。

4.2. 孵化温度对稚龟性状的影响

乌龟幼体的性状受到孵化温度的影响,本研究结果符合之前的研究发现:低温较高温条件下孵出的幼体更大、更重,但高温孵化可以缩短孵化期,在生产养殖中往往有利。同时,过低或过高的温度下孵出幼体往往发育较差,甚至畸形[4]。

研究发现,孵化温度对稚龟重量、背甲长、背甲宽和体高存在显著影响。不管在哪一个时期挪入 31℃孵化,孵出幼体性状与一直在 26℃孵化的相比均存在显著差异。同时,乌龟卵一直在 31℃孵化与在第

15 期挪入 26℃孵化相比, 也出现显著差异。这些结果说明, 在乌龟胚胎发育 TSP 早期发生的温度变化将影响到后代的孵出性状。生产实践中往往采用 30℃~32℃的孵化温度, 孵化周期较短, 但该温度下获得的幼龟性别将以雌性为主。因此, 如果想要获得更多的雄性, 不妨将龟卵先在较低温度下孵化至 15 期, 再置换到有利于加快发育速率的较高温度下。这样既提高了孵出幼体性状指标, 又缩短了胚胎孵化期。

基金项目

国家级大学生创新创业训练计划项目(201710351003), 温州大学 2017 年校级教学改革研究项目(17jg03)。

参考文献

- [1] Deeming, D.C. (2004) Reptilian Incubation: Environment, Evolution and Behaviour. Nottingham University Press, Nottingham.
- [2] Du, W.-G., Zheng, R.-Q. and Shu, L. (2006) The Influence of Incubation Temperature on Morphology, Locomotor Performance, and Cold Tolerance of Hatchling Chinese Three-Keeled Pond Turtles, *Chinemys reevesii*. *Chelonian Conservation and Biology*, **5**, 294-299. [https://doi.org/10.2744/1071-8443\(2006\)5\[294:TIOITO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2744/1071-8443(2006)5[294:TIOITO]2.0.CO;2)
- [3] 郑荣泉, 杜卫国, 张永普, 等. 孵化温度对乌龟胚胎能量利用及矿物质代谢的影响[J]. 动物学报, 2006, 52(1): 21-27.
- [4] Du, W.-G., Hu, L.-J., Lu, J.-L. and Zhu, L.-J. (2007) Effects of Incubation Temperature on Embryonic Development Rate, Sex Ratio and Post-Hatching Growth in the Chinese Three-Keeled Pond Turtle, *Chinemys reevesii*. *Aquaculture*, **272**, 747-753. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.09.009>
- [5] Du, W.-G., Shen, J.-W. and Wang, L. (2009) Embryonic Development Rate and Hatchling Phenotypes in the Chinese Three-Keeled Pond Turtle (*Chinemys reevesii*): The Influence of Fluctuating Temperature versus Constant Temperature. *Journal of Thermal Biology*, **34**, 250-255. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2009.03.002>
- [6] Ewert, M.A., Jackson, D.R. and Nelson, C.E. (1994) Patterns of Temperature-Dependent Sex Determination in Turtles. *Journal of Experimental Zoology*, **270**, 3-15. <https://doi.org/10.1002/jez.1402700103>
- [7] Shine, R. (1999) Why Is Sex Determined by Nest Temperature in Many Reptiles? *Trends in Ecology and Evolution*, **14**, 186-189. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(98\)01575-4](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(98)01575-4)
- [8] Wibbels, T., Bull, J.J. and Crews, D. (1991) Chronology and Morphology of Temperature-Dependent Sex Determination. *Journal of Experimental Zoology*, **260**, 371-381. <https://doi.org/10.1002/jez.1402600311>
- [9] 杜卫国, 沈建伟, 胡凌君, 等. 孵化温度与性别对乌龟幼体大小和生长的影响[J]. 生态学报, 2010, 30(14): 3766-3771.
- [10] 李红敬, 崔友勇. 温度对乌龟孵育和性比的影响[J]. 信阳师范学院学报(自然科学版), 2011, 24(1): 68-70.
- [11] Matsumoto, Y., Buemio, A., Chu, R., Vafaee, M. and Crews, D. (2013) Epigenetic Control of Gonadal Aromatase (cyp19a1) in Temperature-Dependent Sex Determination of Red-Eared Slider Turtles. *PLoS ONE*, **8**, e63599. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063599>
- [12] Ge, C.T., Ye, J., Weber, C., et al. (2018) The Histone Demethylase KDM6B Regulates Temperature-Dependent Sex Determination in a Turtle Species. *Science*, **360**, 645-648. <https://doi.org/10.1126/science.aap8328>
- [13] Greenbaum, E. (2002) A Standardized Series of Embryonic Stages for the Emydid Turtle *Trachemys scripta*. *Canadian Journal of Zoology*, **80**, 1350-1370. <https://doi.org/10.1139/z02-111>
- [14] 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.

知网检索的两种方式：

1. 打开知网首页：<http://cnki.net/>，点击页面中“外文资源总库 CNKI SCHOLAR”，跳转至：<http://scholar.cnki.net/new>，搜索框内直接输入文章标题，即可查询；
或点击“高级检索”，下拉列表框选择：[ISSN]，输入期刊 ISSN：2164-5507，即可查询。
2. 通过知网首页 <http://cnki.net/>顶部“旧版入口”进入知网旧版：<http://www.cnki.net/old/>，左侧选择“国际文献总库”进入，搜索框直接输入文章标题，即可查询。

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：hjas@hanspub.org