

扬子鳄卵孵化过程中卵壳和卵壳膜超微结构的变化

滕俏^① 周永康^② 薛琪琪^① 邹茗惠^① 易平四^② 张雪松^②

王应超^② 刘若亚^② 吴孝兵^③ 潘涛^{③*} 赵金红^{①*}

① 皖南医学院医学寄生虫学教研室 芜湖 241002; ② 安徽扬子鳄国家级自然保护区 宣城 242034;

③ 安徽师范大学生命科学学院 芜湖 241002

摘要: 本研究通过扫描电子显微镜观察了表面附着及未附着黏液、受精及未受精和不同孵化时间下扬子鳄 (*Alligator sinensis*) 卵的卵壳及卵壳膜超微结构。结果发现, 表面附着和未附着黏液、受精或未受精扬子鳄卵的卵壳外表面均具有贯通的不规则孔隙通道, 近似同心圆排列, 并呈阶梯状分层下陷, 部分孔隙中可见堵塞物, 可能是由于表面黏液覆盖。表面黏液可减少卵内水分蒸发及腐蚀坑和凹陷的产生。不同孵化时间的扬子鳄受精卵卵壳外表面也具有分布不均的不规则孔隙和阶梯状的腐蚀坑, 随着孵化时间的延长, 受精卵卵壳外表面可膨胀并在孵化第 30 天观察到大量裂纹, 卵壳外表面的孔隙和裂纹可提高卵壳的气体通透性, 促进胚胎发育。受精及未受精的扬子鳄卵壳内表面可见较多排列不规则的乳突, 乳突间存在孔隙, 在孵化 0~30 d 内, 受精卵内表面孔隙度随时间延长逐渐增加, 而内表面乳突面积逐渐减小。表面附着或未附着黏液、受精或未受精的扬子鳄卵壳膜结构中均可见排列随机且稀疏的网格状角蛋白纤维, 纤维上有较多芽状突起。表面附着或未附着黏液卵、受精或未受精卵的卵壳膜纤维直径和孔隙度总体差异均不显著。在孵化 0~30 d 内, 受精卵卵壳膜纤维直径随时间延长的变化不大, 纤维间孔隙度略有增大。纤维结构可使卵壳膜具有良好的延展性和拉伸性, 在扬子鳄卵孵化过程中起保护作用。

关键词: 扬子鳄; 卵壳; 卵壳膜; 扫描电子显微镜; 超微结构

中图分类号: Q954 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2024) 04-579-09

Ultrastructural Alterations in the Eggshell and Eggshell Membrane of *Alligator sinensis* Eggs During Incubation

TENG Qiao^① ZHOU Yong-Kang^② XUE Qi-Qi^① ZOU Ming-Hui^① YI Ping-Si^②

ZHANG Xue-Song^② WANG Ying-Chao^② LIU Ruo-Ya^②

WU Xiao-Bing^③ PAN Tao^{③*} ZHAO Jin-Hong^{①*}

① Department of Medical Parasitology, Wannan Medical College, Wuhu 241002; ② The State of Chinese Alligator Nature Reserve in Anhui,

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 32000355, 32170525), 安徽省高校学科(专业)拔尖人才学术资助项目 (No. gxbjZD2020071);

* 通讯作者, E-mail: pantao@ahnu.edu.cn, zhaojh@wnmc.edu.cn;

第一作者简介 滕俏, 女, 硕士研究生; 研究方向: 基础医学病原生物学; E-mail: 2239837297@qq.com.

收稿日期: 2023-09-11, 修回日期: 2024-03-15 DOI: 10.13859/j.cjz.202423172

Xuancheng 242034; ③ College of life sciences, Anhui Normal University, Wuhu 241002, China

Abstract: [Objectives] The present study investigates the characteristics and microstructure of the eggshell and eggshell membrane of *Alligator sinensis* eggs, under various conditions of surface mucous adhesion, fertilization status, and incubation time, in order to provide insights to improve the artificial hatching success of *A. sinensis* eggs. **[Methods]** We collected 21 eggs from the National Nature Reserve of Chinese Alligator in Xuancheng City, Anhui Province, China. This collection comprised 12 freshly laid eggs (including 3 fertile eggs with surface mucus, 3 fertile eggs without surface mucus, 3 infertile eggs with surface mucus, and 3 infertile eggs without surface mucus) and 9 fertile eggs with surface mucus at different days of oviposition, including 3 eggs at 10 d, 3 eggs at 20 d and 3 eggs at 30 d. Characteristics and microstructure of the eggshells and eggshell membranes of *A. sinensis* eggs were analyzed using a scanning electron microscope (SEM), under different conditions of surface mucous adhesion, fertilization, and incubation time. Data analyses were performed using the statistical package IBM SPSS (version 22.0). The results of fiber diameter and pore ratio were analyzed by Student's *t*-test. The normal distribution test and homogeneity of variance test of data were analyzed by Shapiro-Wilk test and Levene test, respectively. The results have been showed as mean \pm standard deviation (SD). $P < 0.05$ were considered as statistically significant. **[Results]** Observations showed pore channels traversing the shell surface in approximate concentric circles, hierarchically arranged. Blockages in some pore channels, likely composed of shell surface mucus, were noted. Initially, the eggshell with surface mucus appeared smoother and flatter during early incubation, developing numerous cracks over time (Fig. 1). Surface mucus appeared to reduce water evaporation, thus decreasing the formation of pore channels and cracks. These channels and cracks, attributed to the corrosive effects of carbonic acid and external forces, increased in diameter on the inner shell surface over time (Fig. 2). Irregular mammillary cones were noted on the inner surface of the eggshell, with air spaces between their bases. No significant difference in the number or morphology of mammillary cones between fertile and infertile eggs was observed (Fig. 3). The ultrastructure parameters of the inner surface of freshly laid eggs showed a porosity of approximately 11.85%, increasing with incubation duration to 30.44% at 30 d (Table 1). A negative correlation was noted between the presence of mammillary cones on the inner eggshell surface and incubation duration. Reticular keratin fibers in the eggshell membranes appeared random and sparse, with bud-shaped protrusions aligned on the fibers (Fig. 5). There was no significant difference for the fiber diameter and pore ratio between fertile and infertile eggs ($t = 0.67, P = 0.52; t = 1.28, P = 0.23$). And the fiber diameter and pore ratio between eggs with surface mucus and without surface mucus were also showed no significant difference ($t = 0.21, P = 0.84; t = 1.53, P = 0.16$) (Table 2). The fiber diameter did not differ significantly between fertile eggs at 0 day and 10, 20, 30 days after oviposition ($t = 0.57, P = 0.60; t = 0.22, P = 0.84; t = 0.59, P = 0.59$, respectively) (Table 3). The fiber pore ratio of the fertilized egg increased slightly from $14.14 \pm 2.87\%$ to $17.70 \pm 1.12\%$ within 30 d of oviposition, but the difference was not significant ($t = 2.00, P = 0.15$) (Table 3). **[Conclusion]** During incubation, fertile eggs absorbed external water, leading to crack formation and enhancing egg permeability, which aided embryo development by maintaining humidity. The presence of mammillary cones indicated increased permeability. The loose structure of the inner surface facilitated embryo development. Furthermore, the fiber diameter of eggshell membrane demonstrated a partial correlation with incubation duration and fertilization status.

Key words: *Alligator sinensis*; Eggshell; Eggshell membrane; Scanning electron microscope; Ultrastructure

扬子鳄 (*Alligator sinensis*) 是我国特有的珍稀濒危动物, 根据动物繁殖方式将鳄等爬行动物归类于羊膜动物, 羊膜动物的卵壳具有保护卵免受损伤和病原体侵害的功能, 还能控制空气和水分的交换, 储存和提供胚胎发育所需的物质 (Mikhailov 1991)。对爬行动物卵壳基本结构的研究发现, 卵壳厚度与其生活环境的降水量呈正相关, 而孔隙率与温度呈负相关, 这为爬行动物卵的形态进化提供了新的生态学数据 (D'Alba et al. 2021)。鳄卵的卵壳形态与鸟卵壳相似, 美国短吻鳄 (*A. mississippiensis*) 卵壳的孔隙长度与面积远大于鸟类卵壳, 使其卵壳导电性更高, 提高了卵中氧气和二氧化碳的通透度 (Packard et al. 1979, 孙西寨等 2005)。鳄通常将巢筑在沙泥场地, 以保持巢的湿度, 避免巢中卵含水量降低。而鳄卵卵壳表面的孔隙也能进行有效的水和气体交换, 保护胚胎免受窒息。据报道, 宽吻凯门鳄 (*Caiman latirostris*) 卵的卵壳发生不规则钙化后, 其平均孵化率远低于正常, 原因可能是由于卵壳渗透压增高而导致胚胎脱水 (Fernández et al. 2013)。

目前对扬子鳄卵的发育研究发现, 体积与重量较大的卵有助于鳄卵发育、提高孵化成功率和繁殖成功率 (夏宝山等 2008)。本研究通过扫描电子显微镜观察了表面附着及未附着黏液、受精及未受精和不同孵化时间下扬子鳄卵的卵壳内外表面及卵壳膜的超微结构, 为研究扬子鳄卵发育过程中卵壳的结构变化提供参考。

1 材料与方 法

本研究使用的扬子鳄卵壳均取自安徽扬子鳄国家级自然保护区 (安徽省宣城市, 118°21'18" ~ 119°27'55" E, 30°37'54" ~ 31°04'12" N) 新区的巢中。本实验使用的扬子鳄卵有新生受精卵 6 枚, 包括表面附着和未附着黏液卵各 3 枚; 新生未受精卵 6 枚, 包括表面附着和未附着黏液卵各 3 枚; 孵化时间为

10、20 和 30 d 的受精卵各 3 枚, 所有卵均来自同一巢。

在各枚卵壳的相同部位分别取下数块约 2 mm × 2 mm 的样品, 编号记录。参照文献方法 (王佳月等 2007), 将用于内表面观察的卵壳放入 5% NaOH 溶液煮沸 5 min, 以去除卵壳膜。将去除卵壳膜的卵壳样品放入蒸馏水中冲洗 5 min 后使用乙醇梯度脱水。所有样品自然干燥后放入离子溅射仪中喷金, 逐块观察其内、外表面及卵壳膜结构。用扫描电子显微镜 (赛可, SNE-4500 MP Plus) 观察拍照。

使用 Image J 软件识别并计算扬子鳄卵壳外表面孔隙直径、内表面孔隙度及乳突面积、卵壳膜上纤维直径及孔隙度, 根据 $H = s/S$ 公式计算孔隙度 (Baheti et al. 2017, 马逸霄等 2022), 式中 H 为孔隙度, s 为孔隙面积, S 为图像总面积。

使用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。表面附着及未附着黏液、受精及未受精状态下及孵化 0 ~ 30 d 的扬子鳄卵壳膜纤维直径和纤维间孔隙度的正态分布检验采用 Shapiro-Wilk 分析, 方差齐性检验采用 Levene 分析, 组间比较采用 t 检验。数据均以平均值 ± 标准差 (Mean ± SD) 表示, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。每组均使用 3 枚鳄卵进行三组重复实验取平均值。

2 结 果

2.1 卵壳结构观察

扬子鳄卵壳的外表面较为粗糙、凹凸不平, 表面附着和未附着黏液卵以及受精或未受精卵的卵壳外表面均能观察到大小不等、分布不均、深浅不一的不规则孔隙, 且均存在部分孔隙中有堵塞物的现象 (图 1)。位于外表面的孔洞直径约为 100 μm, 表现为火山口状, 呈近似同心圆排列的多环结构, 并呈现阶梯状分层下陷 (图 1)。不同孵化时间的扬子鳄受精卵壳外表面均能看到分布不均的不规则孔隙和阶梯状的腐蚀坑 (图 2)。随着孵化时间的延长, 外表

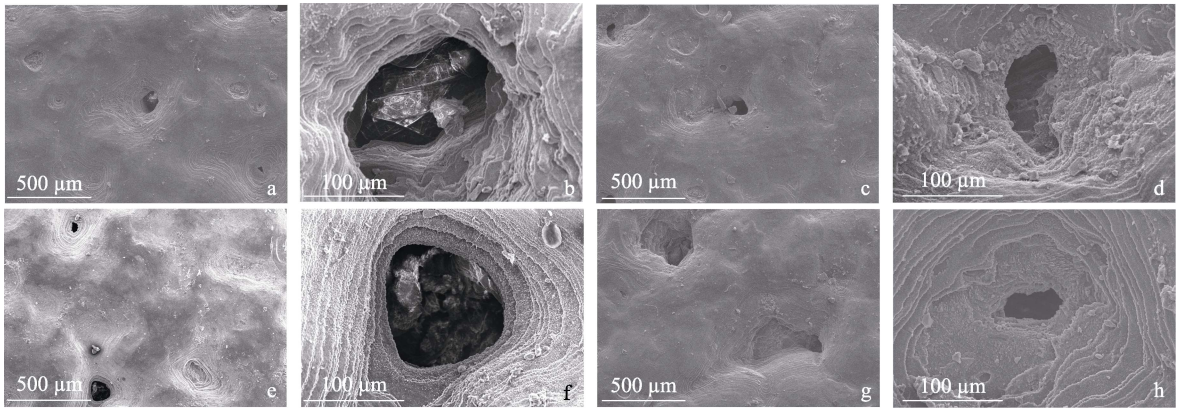


图 1 表面附着或未附着黏液、受精及未受精扬子鳄卵壳外表面孔隙形态

Fig. 1 Pore configuration of the outer surface of *Alligator sinensis* eggshell observed under different surface mucous adhesion and fertilization status

a. 表面未附着黏液的受精卵壳外表面总体观 (× 100); b. 表面未附着黏液的受精卵壳外表面孔隙 (× 600); c. 表面未附着黏液的未受精卵壳外表面总体观 (× 100); d. 表面未附着黏液的未受精卵壳外表面孔隙 (× 600); e. 表面附着黏液的受精卵壳外表面总体观 (× 100); f. 表面附着黏液的受精卵壳外表面孔隙 (× 600); g. 表面附着黏液的未受精卵壳外表面总体观 (× 100); h. 表面附着黏液的未受精卵壳外表面孔隙 (× 600)。

a. Outer surface of fertile eggs without surface mucus (× 100); b. Pore channel of fertile eggs without surface mucus (× 600); c. Outer surface of infertile eggs without surface mucus (× 100); d. Pore channel of infertile eggs without surface mucus (× 600); e. Outer surface of fertile eggs with surface mucus (× 100); f. Pore channel of fertile eggs with surface mucus (× 600); g. Outer surface of infertile eggs with surface mucus (× 100); h. Pore channel of infertile eggs with surface mucus (× 600).

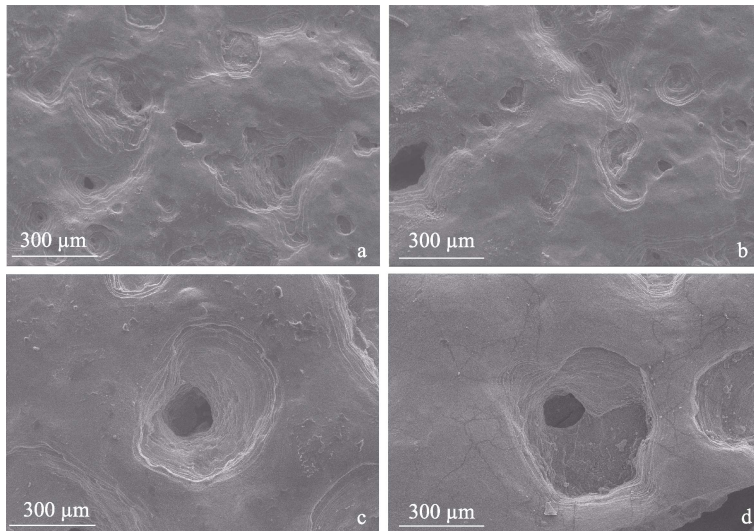


图 2 不同孵化时间下扬子鳄受精卵壳外表面孔隙形态

Fig. 2 Pore configuration of the outer surface of *Alligator sinensis* eggshell at different days after oviposition

a. 新生受精卵壳外表面总体观 (× 130); b. 孵化 10 d 受精卵壳外表面总体观 (× 130); c. 孵化 20 d 受精卵壳外表面总体观 (× 130); d. 孵化 30 d 受精卵壳外表面总体观 (× 130)。

a. Outer surface of freshly laid fertile eggs (× 130); b. Outer surface of fertile eggs at 10 d after oviposition (× 130); c. Outer surface of fertile eggs at 20 d after oviposition (× 130); d. Outer surface of fertile eggs at 30 d after oviposition (× 130).

面的孔隙扩大，新生卵中可见直径约为 23.64 μm 的孔隙，而孵化 30 d 时孔隙直径可达 141.86 μm 。在孵化 30 d 的卵壳外表面可观察到大量裂纹存在于孔隙与腐蚀坑附近，而孵化 0、10 和 20 d 的卵壳外表面均未观察到明显裂纹（图 2）。

对扬子鳄卵壳脱去卵壳膜后的内表面结构进行扫描电镜观察发现（图 3），内表面可见较多排列不规则的乳突，乳突分布较稀疏，大小相对均匀，其间存在分布不均的孔隙，且受精及未受精卵的卵壳内表面乳突排列差别不明显（图 3），形态结构相似，直径均约为 150 μm 。不同孵化时间（0、10、20 和 30 d）的扬子鳄受精卵卵壳内表面乳突结构未见明显差异（图 4），但孵化 0 d 的扬子鳄卵壳内表面结构较为紧密（表 1），孔隙度约为 11.85%，随着孵化时间延长，孔隙度逐渐增加，30 d 时孔隙度上升至 30.44%。受精卵内表面乳突面积与孵化时

间呈负相关。

2.2 卵壳膜结构观察

卵壳膜位于扬子鳄卵外壳的下方，且与内表面结合较紧密。扬子鳄卵壳膜上具有交叉排列呈网格状的蛋白质纤维。网格状蛋白质纤维排列随机且稀疏，纤维间可见较多孔隙，在显微结构中可见较多的芽状突起及嵌入蛋白质纤维的乳突状结构（图 5）。表面附着或未附着黏液卵、受精或未受精卵的卵壳膜纤维直径和孔隙度总体差异均不显著（表 2）。纤维间隙中均未发现堵塞物，角蛋白纤维在孔隙度、密度和排列方式上亦无明显区别。

新生卵及孵化 10、20 和 30 d 扬子鳄受精卵的卵壳膜中均可观察到直径和排列相似的网格状蛋白（图 6）。与新生受精卵相比，孵化 10 d（ $t = 0.57, P = 0.60$ ）、20 d（ $t = 0.22, P = 0.84$ ）和 30 d（ $t = 0.59, P = 0.59$ ）卵壳膜纤维直径差异无统计学意义（表 3）。与新生受精卵卵壳膜

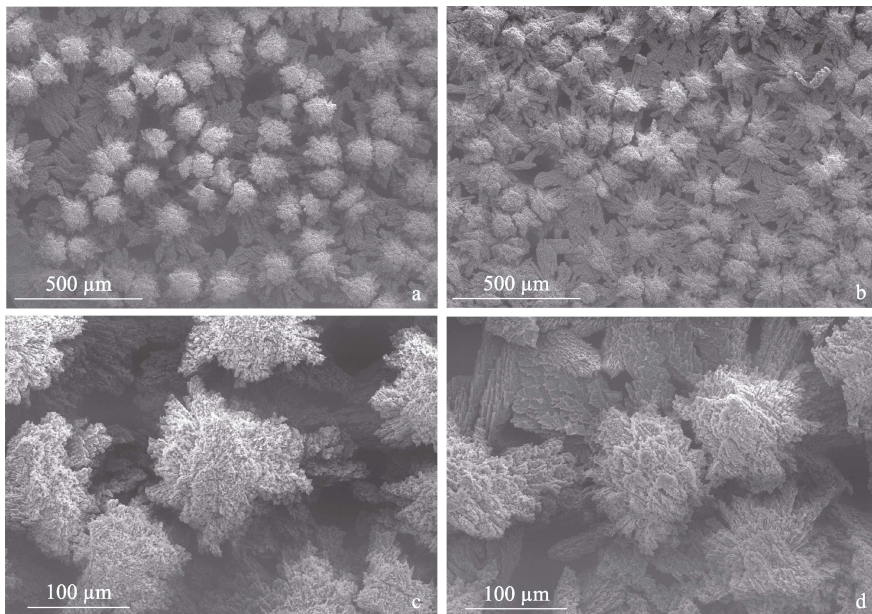


图 3 受精及未受精扬子鳄卵卵壳内表面乳突形态

Fig. 3 Mammillary cones configuration of the inner surface of eggshells of fertile and infertile *Alligator sinensis* eggs

a. 受精卵壳内表面总体观 ($\times 100$); b. 未受精卵壳内表面总体观 ($\times 100$); c. 受精卵壳内表面乳突 ($\times 400$); d. 未受精卵壳内表面乳突 ($\times 400$).

a. Inner surface of fertile eggs ($\times 100$); b. Inner surface of infertile eggs ($\times 100$); c. Mammillary cones on the inner surface of fertile eggs ($\times 400$); d. Mammillary cones on the inner surface of infertile eggs ($\times 400$).

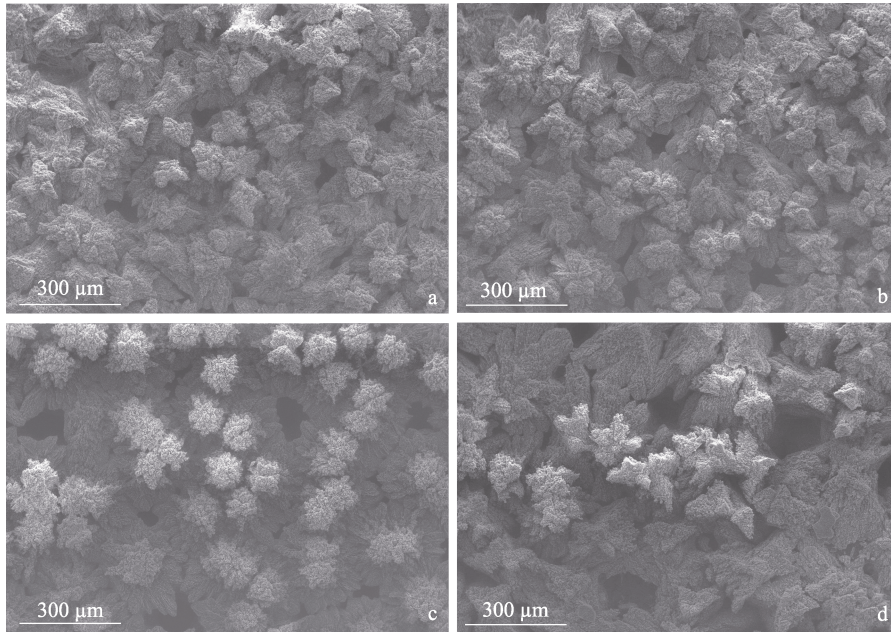


图 4 不同孵化时间下扬子鳄受精卵卵壳内表面乳突形态

Fig. 4 Mammillary cone configuration of the inner surface of *Alligator sinensis* eggshells at different days after oviposition

a. 新生受精卵壳内表面总体观 (× 130); b. 孵化 10 d 受精卵壳内表面总体观 (× 130); c. 孵化 20 d 受精卵壳内表面总体观 (× 130); d. 孵化 30 d 受精卵壳内表面总体观 (× 130).
 a. Inner surface of the eggshell of freshly laid fertile eggs (× 130); b. Inner surface of fertile eggs at 10 d after oviposition (× 130); c. Inner surface of fertile eggs at 20 d after oviposition (× 130); d. Inner surface of fertile eggs at 30 d after oviposition (× 130).

表 1 不同孵化时间下扬子鳄受精卵卵壳内表面乳突结构参数分析

Table 1 Analysis of mammillary cone ultrastructure parameters on the inner surface of *Alligator sinensis* eggshells at different days after oviposition

	受精卵孵化时间 Days of oviposition (d)			
	0	10	20	30
乳突面积 Mammillary cones area (%)	59.30	65.37	43.91	29.74
孔隙度 Pore ratio (%)	11.85	15.69	23.11	30.44

表 2 表面附着及未附着黏液和受精及未受精扬子鳄卵的卵壳膜超微结构参数分析

Table 2 Analysis of eggshell membrane ultrastructural parameters of *Alligator sinensis* eggs at different surface mucous adhesion and fertilization status

	受精状态 Fertilization status				表面黏液附着状态 Surface mucus status			
	受精卵 Fertile eggs	未受精卵 Infertile eggs	<i>t</i>	<i>P</i>	表面附着黏液卵 With surface mucus	表面未附着黏液卵 Without surface mucus	<i>t</i>	<i>P</i>
纤维直径 Fiber diameter (μm)	1.28 ± 0.55	1.10 ± 0.38	0.67	0.52	1.22 ± 0.53	1.16 ± 0.42	0.21	0.84
孔隙度 Pore ratio (%)	17.03 ± 3.05	14.97 ± 2.49	1.28	0.23	14.81 ± 2.29	17.20 ± 3.06	1.53	0.16

P < 0.05 表示差异有统计学意义。 *P* < 0.05 represents significant differences.

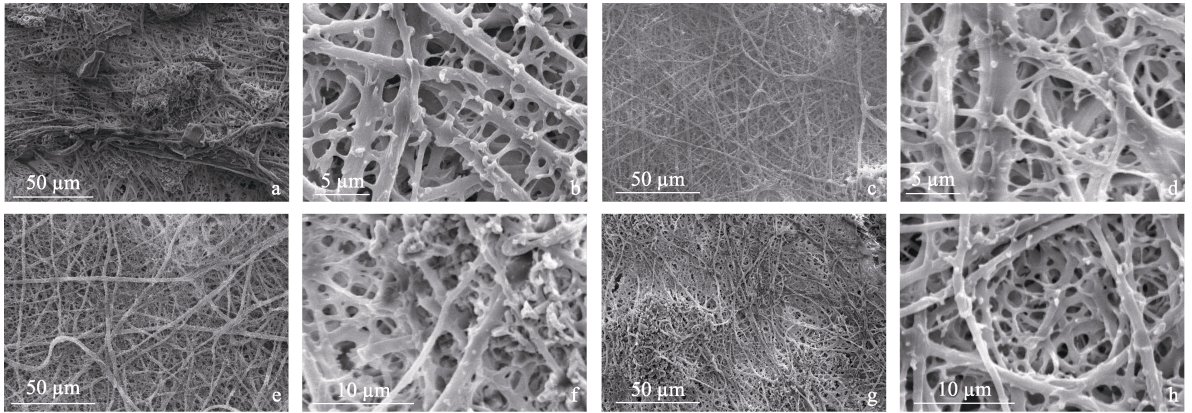


图 5 表面附着及未附着黏液、受精及未受精扬子鳄卵卵壳膜形态

Fig. 5 Morphological characteristics of eggshell membranes of *Alligator sinensis* eggs under different surface mucous adhesion and fertilization status

a. 表面未附着黏液的受精卵卵壳膜 (× 950); b. 表面未附着黏液的受精卵卵壳膜 (× 6 500); c. 表面未附着黏液的未受精卵卵壳膜 (× 1 000); d. 表面未附着黏液的未受精卵卵壳膜 (× 6 500); e. 表面附着黏液的受精卵卵壳膜 (× 1 000); f. 表面附着黏液的受精卵卵壳膜 (× 6 000); g. 表面附着黏液的未受精卵卵壳膜 (× 1 000); h. 表面附着黏液的未受精卵卵壳膜 (× 6 000).

a. Eggshell membranes of fertile eggs without surface mucus (× 950); b. Eggshell membranes of fertile eggs without surface mucus (× 6 500); c. Eggshell membranes of infertile eggs without surface mucus (× 1 000); d. Eggshell membranes of infertile eggs without surface mucus (× 6 500); e. Eggshell membranes of fertile eggs with surface mucus (× 1 000); f. Eggshell membranes of fertile eggs with surface mucus (× 6 000); g. Eggshell membranes of infertile eggs with surface mucus (× 1 000); h. Eggshell membranes of infertile eggs with surface mucus (× 6 000).

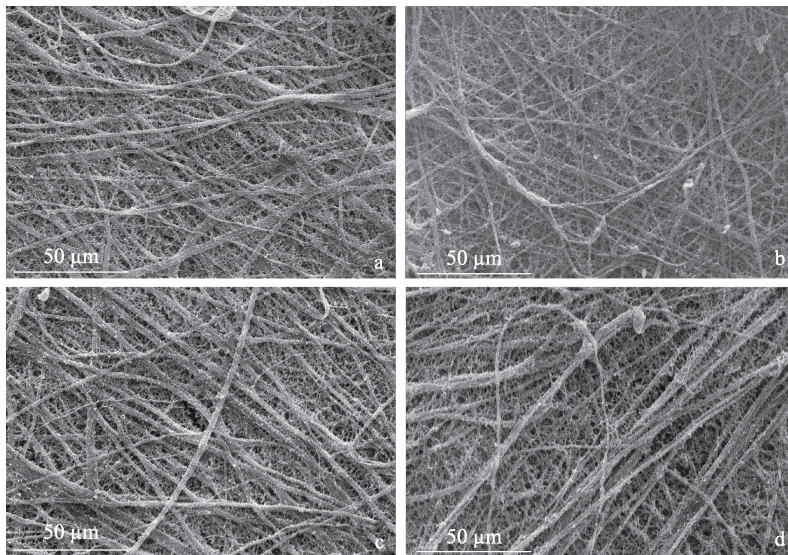


图 6 不同孵化时间下扬子鳄卵卵壳膜形态

Fig. 6 Morphological characteristics of eggshell membranes of *Alligator sinensis* eggs at different days of oviposition

a. 新生受精卵卵壳膜 (× 1 000); b. 孵化 10 d 的受精卵卵壳膜 (× 1 000); c. 孵化 20 d 的受精卵卵壳膜 (× 1 000); d. 孵化 30 d 的受精卵卵壳膜 (× 1 000).

a. Eggshell membranes of freshly laid fertile eggs (× 1 000); b. Eggshell membranes of fertile eggs at 10 d of oviposition (× 1 000); c. Eggshell membranes of fertile eggs at 20 d of oviposition (× 1 000); d. Eggshell membranes of fertile eggs at 30 d of oviposition (× 1 000).

表 3 不同孵化时间扬子鳄卵壳膜超微结构参数

Table 3 Ultrastructure parameters of eggshell membrane of *Alligator sinensis* eggs at different days of oviposition

	受精卵孵化时间 Days of oviposition (d)			
	0	10	20	30
纤维直径 Fiber diameter (μm)	0.84 \pm 0.49	1.08 \pm 0.52	0.67 \pm 0.30	1.09 \pm 0.54
孔隙度 Pore ratio (%)	14.14 \pm 2.87	14.62 \pm 2.16	18.31 \pm 1.67	17.70 \pm 1.12

的纤维间孔隙度相比，孵化 10、20 和 30 d 后卵壳膜纤维间孔隙度逐渐增大，但与新生受精卵相比差异均无统计学意义（分别为 $t = 0.23$, $P = 0.83$; $t = 1.39$, $P = 0.27$; $t = 2.00$, $P = 0.15$ ）（表 3）。

3 讨论

扬子鳄卵的卵壳分为两个基本层，外层的钙化层称为外壳，内部的有机纤维层称为卵壳膜。本研究通过扫描电子显微镜观察了扬子鳄卵的卵壳结构，分析了表面附着及未附着黏液、受精及未受精和不同孵化时间下扬子鳄卵的卵壳及卵壳膜结构差异。以往研究表明，卵壳的外表面有一层由输卵管腺体分泌的透明蛋白质保护膜，能够起到保护卵壳以免碰撞受损及封闭气孔的作用（王绍清等 2013），卵壳表面的黏液还可以湿润卵壳，以免卵破裂。鳄卵外表面的孔隙主要是外因引起的，与卵内胚胎发育关系不明显，因此受精及未受精扬子鳄卵的卵壳外表面均可见形态相似的孔隙（潘鸿春等 1997）。本研究也发现，受精及未受精扬子鳄卵壳外表面均较为粗糙且凹凸不平，并在外表面都具有特殊的近似同心圆排列的阶梯状孔隙。据报道，在孵化初期封闭气孔也可以保持卵的内部水分，防止细菌侵袭，对卵起保护作用。此外，在孵化 30 d 的卵壳外表面可观察到大量裂纹存在于孔隙与腐蚀坑附近，这可能是由于受精的扬子鳄卵在孵化过程中吸收外界水分而使内容物膨胀，因而卵壳产生裂纹。裂纹的出现也有助于提高卵对水分和气体的通透性，利于保持胚胎发育所需要的湿度。有研究发现，宽吻凯门鳄巢中植被产生的酸性代谢产物经微生物发酵后与碳酸结合，可溶解外层致密壳层

中的方解石晶体（Fernández et al. 2013）。这种效应也可能与本研究所观察到的卵壳表面孔隙增大有关。与本研究相类似，美国短吻鳄卵壳外表面也发现了近似同心圆排列的多环下陷孔隙，且随着孵育过程的进行，孔隙数量逐渐增多，孔隙逐渐增大（Wink et al. 1990）。在宽吻凯门鳄卵对水淹的耐受程度研究中，表面粗糙的卵被水淹没时表面产生更多气泡，可在短时间内促进卵壳内部气体交换，减少胚胎发育早期被淹没引起的畸形率和死亡率（Cedillo-Leal et al. 2017）。恐龙卵壳化石中也发现了表面孔隙，这为羊膜动物卵壳演化过程的研究提供了重要的理论基础（Stein et al. 2019）。这些外表面的孔隙可提高卵壳对气体的通透性，以促进发育中的胚胎呼吸。此外，卵壳外表面的孔隙和裂纹会使卵壳更脆，易碎裂，进而使雏鳄易破壳出生（潘鸿春等 1997）。本研究中，扬子鳄卵的卵壳部分孔隙中可见堵塞物，可能是由于表面黏液覆盖，具体堵塞物成分有待进一步研究。

扬子鳄卵壳内表面可见分布稀疏、形状不规则、大小相近的乳突，乳突间有较多孔隙。有研究表明，部分孔隙可穿过卵壳与外表面气孔相连通，促进胚胎呼吸作用；且在胚胎发育中由于内在降解作用，受精卵卵壳内表面气孔可能比未受精卵的更多（潘鸿春等 1997）。本研究未发现受精和未受精扬子鳄卵以及孵化 0 ~ 30 d 扬子鳄受精卵的卵壳内表面孔隙数量有明显差异，这可能与实验的受精卵样本胚胎发育时间较短，以及生物样本的自然高变异性有关。但本研究中发现，扬子鳄卵壳内表面孔隙直径与孵化时间呈正相关，不规则孔隙从较为紧密变得逐渐疏松；而乳突面积与孵化时间呈负相关。这个结果也从另一角度证明了卵壳的

渗透性，疏松的内表面孔隙可能有利于扬子鳄胚胎顺利发育和孵化。

在对扬子鳄卵壳膜的电镜观察中，本研究发现了排列随机且稀疏的网格状角蛋白纤维。鸟类的卵壳结构与扬子鳄相类似，如鹌鹑 (*Coturnix japonica*) 的卵壳膜纤维密度及突起数量与本研究结果较接近 (王佳月等 2007)。舟山眼镜蛇 (*Naja atra*) 卵壳膜上随机排列的角蛋白纤维结构能增加卵壳韧性，表现出良好的延展性和拉伸性 (Chang et al. 2016)。尼罗鳄 (*Crocodylus niloticus*) 卵壳内表面乳突数量与卵壳厚度也呈正相关，即在卵壳赤道处乳突数量较多，并向两极减少 (Lensink et al. 2023)。本研究还发现，扬子鳄卵壳膜纤维直径与卵孵化时间和是否受精有部分相关性，但还需进一步扩大样本量来证实本研究结果，以阐明卵壳膜纤维直径随卵孵化时间和受精状态的改变。卵壳膜可能在扬子鳄卵孵化过程中起稳定胚胎正常发育的内环境作用，阻隔病原微生物侵入，也与胚胎代谢物质的转运过程相关。而乳突的具体作用和功能有待后续实验进一步研究。

综上所述，本研究通过扫描电子显微镜观察了扬子鳄卵壳内、外表面结构和发育过程中的一定变化。结果发现表面附着及未附着黏液、受精及未受精扬子鳄卵的卵壳表面均具有近似同心圆排列的阶梯状孔隙，卵壳上的裂纹和孔隙空间结构在扬子鳄胚胎发育过程中可能起稳定内环境、提高空气和水分等物质转运的重要作用；卵壳膜上排列松散的网格状纤维可增强卵的弹性和强度，较厚的纤维组织也有利于防止微生物入侵。因此在扬子鳄卵人工孵化过程中，应注意避免损坏鳄卵表面黏液，减少外界有害微生物的入侵，这在一定程度上可能提高鳄卵的孵化率。

参 考 文 献

- Baheti S, Tunak M. 2017. Characterization of fiber diameter using image analysis. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 254(14): 142002.
- Cedillo-Leal C, Simoncini M S, Leiva P M L, et al. 2017. Eggshell structure in *Caiman latirostris* eggs improves embryo survival during nest inundation. Proceedings of the Royal Society B: Biological Science, 284(1854): 20162675.
- Chang Y, Chen P Y. 2016. Hierarchical structure and mechanical properties of snake (*Naja atra*) and turtle (*Ocadia sinensis*) eggshells. Acta Biomaterialia, 31: 33–49.
- D'Alba L, Goldenberg J, Nallapaneni A, et al. 2021. Evolution of eggshell structure in relation to nesting ecology in non-avian reptiles. Journal of Morphology, 282(7): 1066–1079.
- Fernández M S, Simoncini M S, Dyke G. 2013. Irregularly calcified eggs and eggshells of *Caiman latirostris* (Alligatoridae: Crocodylia). Naturwissenschaften, 100(5): 451–457.
- Lensink A V, Swan G E, Myburg J G. 2023. The structure of the eggshell and eggshell membranes of *Crocodylus niloticus*. Journal of Microscopy, 290(1): 23–39.
- Mikhailov K. 1991. Classification of fossil eggshells of amniotic vertebrates. Acta Palaeontologica Polonica, 36(2): 193–238.
- Packard G C, Taigen T L, Packard M J, et al. 1979. Water-vapor conductance of testudinian and crocodilian eggs (class Reptilia). Respiration Physiology, 38(1): 1–10.
- Stein K, Prondvai E, Huang T, et al. 2019. Structure and evolutionary implications of the earliest (Sinemurian, Early Jurassic) dinosaur eggs and eggshells. Scientific Reports, 9: 4424.
- Wink C S, Elsey R M, Bouvier M. 1990. The relationship of pores and mammillae on the inner surface of the eggshell of the alligator (*Alligator mississippiensis*). Journal of Morphology, 204(2): 227–233.
- 马逸霄, 田雅宁, 王巧华. 2022. 鸡蛋蛋壳膜超微结构与呼吸强度的相关关系. 农业工程学报, 38(4): 316–323.
- 潘鸿春, 年士政, 陈壁辉. 1997. 扬子鳄 (*Aligator sinensis*) 卵壳的扫描电镜观察. 解剖学报, 28(1): 99–102.
- 孙西寨, 朱道玉, 杨恩昌. 2005. 羊膜卵的生理生态学. 菏泽学院学报, 27(5): 61–63.
- 王佳月, 唐思贤, 王洁, 等. 2007. 四种鸟类卵壳的扫描电镜观察. 华东师范大学学报: 自然科学版, 25(2): 65–71.
- 王绍清, 曹红, 曹宝森. 2013. 扫描电镜法观察鸡蛋壳超微结构形貌. 食品科学, 34(13): 110–114.
- 夏宝山, 吴孝兵, 朱家龙, 等. 2008. 扬子鳄 (*Alligator sinensis*) 卵体积和重量估算及其对孵化成功率的影响. 生态学报, 28(7): 3042–3048.