

# 中华草龟胚胎发育过程中钙含量的变化

梁阳阳<sup>1,2</sup>, 崔凯<sup>1,2</sup>, 李静<sup>1,2</sup>, 方婷<sup>1,2</sup>, 高娜<sup>1,2</sup>, 赵秀侠<sup>1,2</sup>, 杨坤<sup>1,2</sup>, 项旭东<sup>3</sup>, 卢文轩<sup>1,2\*</sup> (1.安徽省农业科学院水产研究所, 安徽合肥 230001; 2.水产增殖安徽省重点实验室, 安徽合肥 230001; 3.安徽蓝田农业集团有限公司, 安徽芜湖 238326)

**摘要** [目的]研究中华草龟胚胎发育过程中钙的来源和代谢规律。[方法]采集了中华草龟受精卵200枚, 恒温箱中30℃孵化, 检测胚胎发育过程中卵各组分中钙含量的变化。[结果]中华草龟孵化期52~65 d, 平均57.2 d。孵化的前25 d胚胎钙含量较低, 蛋黄、蛋清和蛋壳内钙含量无明显变化, 第30天开始胚胎钙含量迅速增加, 蛋清中钙含量迅速减少, 直至被吸收殆尽; 蛋黄中钙第30~35天不断减少, 第40天有所增加, 此后不断减少至出壳时吸收殆尽。第40天开始, 蛋壳内钙含量显著增加, 蛋壳中钙含量降低, 表明蛋壳开始成为胚胎发育的主要钙源。整个孵化期, 蛋黄、蛋清和蛋壳为胚胎发育分别提供了9.6%、24.9%和65.5%的钙。[结论]蛋壳是中华草龟胚胎发育过程中的主要钙源。该研究是对中华草龟胚胎发育过程中受精卵各组分钙含量变化的首次报道。

**关键词** 中华草龟; 胚胎发育; 孵化; 钙代谢

中图分类号 S966.5 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2021)06-0103-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2021.06.028



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

## Variation of Calcium Content in *Chinemys reevesiis* during the Embryonic Development Process

LIANG Yang-yang<sup>1,2</sup>, CUI Kai<sup>1,2</sup>, LI Jing<sup>1,2</sup> et al (1. Fisheries Research Institute, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei, Anhui 230001; 2. Key Laboratory of Aquaculture and Stock Enhancement in Anhui Province, Hefei, Anhui 230001)

**Abstract** [Objective] To study the sources and metabolic pattern of calcium in *Chinemys reevesiis* during the embryonic development process. [Method] 200 fertilized eggs of *C. reevesiis* were collected and incubated in a thermostat at 30 °C. The changes of calcium content in each component of egg during the embryonic development process were detected. [Result] The incubation period of *C. reevesiis* was from 52 days to 65 days, with the average of 57.2 days. The calcium content in the embryo was lower during the first 25 days, while calcium content in the yolk, albumen and eggshell had no significant change during the first 25 days. From the 30<sup>th</sup> day, calcium content in the embryo began to increase rapidly, while calcium content in the albumen began to decrease rapidly until it was completely absorbed. The calcium content in the yolk decreased continuously from the 30<sup>th</sup> day to the 35<sup>th</sup> day of incubation, and increased on the 40<sup>th</sup> day, and then began to decrease rapidly until it was completely absorbed at the end of incubation. From the 40<sup>th</sup> day, the calcium in egg contents (yolk and albumen) increased significantly and that in the eggshell decreased, indicating eggshell began to become the main source of calcium during the embryonic development process. During the whole incubation period, yolk, albumen and eggshell provided 9.6%, 24.9% and 65.5% calcium respectively for the embryonic development. [Conclusion] Eggshell was the main source of calcium during the embryo development of *C. reevesiis*. This study provided the variation of calcium content in each component of *C. reevesiis* eggs during the embryonic development process for the first time.

**Key words** *Chinemys reevesiis*; Embryonic development; Incubation; Calcium metabolism

脊椎动物的卵有复杂的物理结构和化学组成, 为胚胎发育提供稳定的环境和充足的营养物质。卵内营养元素种类多, 部分营养元素并不是胚胎发育所必需的, 而有些元素的含量并不能满足胚胎发育的需要, 需要外源输入, 胚胎发育过程中不同营养物质的代谢过程是胚胎学研究的重点问题之一<sup>[1]</sup>。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, 参与多个生物感受过程, 对胚胎的健康发育至关重要, 是胚胎学研究中最为关注的营养元素之一<sup>[2-3]</sup>。在卵生脊椎动物中, 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, 卵壳是胚胎发育重要的钙等营养物质的重要来源<sup>[1]</sup>。爬行动物出壳时通常体被钙化鳞片(蛇类、鳄类等、蜥蜴类)或骨板(龟鳖类), 胚胎发育过程中钙的需求量大, 其钙代谢非常具有代表性。

中华草龟(*Chinemys reevesiis*), 又名乌龟、金龟、泥龟等, 隶属于龟鳖目(Testudinate) 龟科(Emydidae) 乌龟属(*Chinemys*), 在我国除东北和西部地区外均有分布, 是我国现存龟

类中分布最广、养殖数量最多的品种之一<sup>[4]</sup>。龟类在出壳时已经形成高度钙化的胸甲、腹甲外壳和内骨骼, 胚胎发育过程中对钙的需求量很大。最新研究表明, 龟类胚胎发育过程中, 性腺体细胞内钙离子水平的高低对性别决定基因 *Dmrt1* 表达具有决定性作用, 进而影响性别分化<sup>[5]</sup>。目前, 关于龟类胚胎发育过程中钙代谢的研究较少。由文辉等<sup>[6]</sup>研究了中华草龟胚胎钙的来源, 但关于中华草龟孵化过程中钙的转化规律未见报道。笔者通过对孵化期间中华草龟受精卵蛋黄、蛋白、蛋壳和胚胎中钙含量的连续测定, 首次探究了各组分中钙含量的变化规律, 旨在为中华草龟的繁殖生物学提供新资料, 为爬行类动物胚胎发育机理及其对营养物质的利用等方面研究奠定基础。

## 1 材料与方法

**1.1 样本采集** 中华草龟卵于2019年6月采自安徽蓝田农业集团有限公司中华草龟产卵场, 以卵中部乳白色受精斑作为正常受精判别特征, 采集形状相似、大小均一的受精卵200枚带回实验室孵化, 单枚卵重6.67~7.92 g, 平均卵重7.43 g。

**1.2 室内孵化** 以蛭石为孵化基质, 蛭石与水的质量比为1:1, 铺在塑料孵化盒中, 将受精卵白斑朝上, 埋入蛭石中2 cm, 置于恒温培养箱中孵化。孵化温度设置为30℃, 每天定时称量孵化盒总质量, 用喷壶洒水补充孵化损失水分。

**基金项目** 安徽省重点研究与开发计划项目(201904a06020023, 201904f-06020053); 安徽省中央引导地方科技发展专项项目(201907-d06200003)。

**作者简介** 梁阳阳(1990—), 男, 安徽长丰人, 助理研究员, 博士, 从事水产养殖研究。\*通信作者, 研究员, 硕士, 从事水产养殖研究。

**收稿日期** 2020-08-07

**1.3 测量取样** 自孵化第0天(刚孵化时)开始,每5 d取样,直至幼体破壳,每次取10枚正常发育卵,低温致死,分离蛋黄、蛋清、胚胎、蛋壳(含壳膜),使用分析天平称重(精确至0.1 mg),拍照,为了方便检测,每2枚卵混合为一个样本,塑料瓶冷冻保存。超纯水冲洗卵壳内表面,吸水纸吸干,冲洗液放入卵清中,烘箱中80℃烘干备用。第0~15天胚胎太小,无法单独测量钙含量,将其钙纳入卵清中测量,第20天开始单独测量胚胎钙含量;第55天,很多样本已破壳,挑取破卵样本检测。

**1.4 钙含量测定** 样品在干燥箱中80℃烘干至恒重,研磨成粉,称取固体试样于带刻度消化管中,加入10 mL硝酸和0.5 mL高氯酸,电热炉上消解,消化液呈棕褐色,加数滴硝酸,冷却后溶液呈无色透明或略带黄色后,移至50 mL容量瓶中,去离子水洗涤消化管3次,洗液收集于容量瓶中,加去离子水定容至50 mL,采用火焰原子吸收光谱法对溶液中钙离子浓度进行测定。测定仪器参数设置如下:测定波长422.7 nm,狭缝宽1.3 nm,灯电流10 mA,燃烧器高度7 mm,空

气流量9 L/min,燃气(乙炔)流量2 L/min<sup>[7]</sup>。

**1.5 数据处理** 采用Excel 2010软件进行数据统计与分析,使用SPSS 16.0统计软件进行差异显著性分析,使用Origin 8.0软件绘图。

## 2 结果与分析

**2.1 中华草龟胚胎发育的钙来源** 200枚卵中,孵化过程中死亡受精卵47枚,死亡率23.5%,试验用卵110枚,共孵化出幼龟43个,试验孵化期52~65 d,平均孵化期57.2 d。孵化前,整个卵的平均钙含量330.77 mg/枚,其中卵壳钙含量324.11 mg/枚,占卵总钙含量的98.0%;卵内含物中蛋黄中钙含量4.81 mg/枚、蛋清中钙含量1.85 mg/枚。临出壳时,蛋壳平均钙含量253.03 mg/枚,较孵化前减少71.08 mg/枚;蛋黄和蛋清几乎完全吸收,稚龟钙含量19.3 mg/枚,较孵化前卵内总钙含量增加12.64 mg/枚,表明中华草龟胚胎发育过程中卵黄和卵清提供34.5%的钙,其余65.5%的钙卵壳提供,占卵壳孵化期钙损失的17.8%,卵壳是胚胎发育过程中主要钙源(图1)。

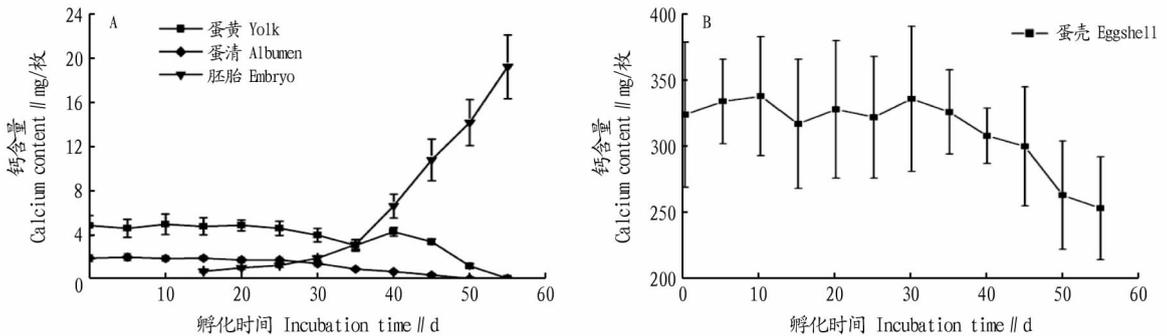


图1 孵化期间蛋黄、蛋清、胚胎和蛋壳中钙含量的变化

Fig.1 The changes of calcium in the yolk, albumen, embryo and eggshell during the incubation process

**2.2 孵化过程中卵内各组分钙含量的变化** 在孵化的前25 d,胚胎钙含量较低,蛋黄、蛋清和蛋壳中钙的含量无明显变化(图1),此时胚胎逐渐发育出清晰的背甲,通体呈乳白色半透明(图2);30 d时,胚胎颜色加深,腹甲清晰可见,背甲肋骨清晰可数,钙含量进一步增加,蛋黄和蛋清中钙含量分别减少13.2%和19.6%,与25 d时差异显著( $P < 0.05$ ),蛋黄和蛋清中钙含量开始快速减少,蛋壳中钙含量未发生显著变化;40 d时,胚胎由乳白色变成灰色,背甲和腹甲明显开始钙化,硬度增强,胚胎体型和钙含量均进入快速增长阶段(图3),卵内总钙含量显著增加,蛋壳开始变薄,钙含量较孵化初期显著减少( $P < 0.05$ ),蛋壳开始成为胚胎发育的主要钙来源,蛋黄中钙含量出现增加,表明蛋黄开始富集蛋壳中的钙,同时卵开始吸收环境中的水膨大;45 d时,卵吸水达最重,卵壳钙质层产生细丝状裂纹,胚胎进一步钙化,蛋清较稀,钙含量急剧减少,蛋黄中钙含量也减少;55 d时,大部分卵开始或即将破壳,稚龟形成,背甲、腹甲及身体内骨骼高度钙化,卵壳与卵膜全部或部分分离,尿囊干瘪,卵黄囊吸收殆尽缩入腹腔,或少部分存留体外,在孵化后2~3 d内缩入腹腔,未吸收的卵黄未单独测定钙含量,纳入胚胎中。

整体来看,孵化的前25 d,卵各组分中钙含量变化较小,

30 d开始胚胎进入快速生长阶段,钙含量迅速增加,蛋清和蛋黄中钙开始显著减少。此后,蛋清中钙不断减少,直至50 d时吸收殆尽,而蛋黄中钙含量在40 d时出现上升,此后不断减少,直至出壳时被吸收殆尽;从40 d开始胚胎钙化,蛋壳成为胚胎发育的主要钙源。

## 3 结论与讨论

卵生脊椎动物孵化过程中,胚胎对物质和能量的利用在不同物种间存在显著差异<sup>[1]</sup>。有鳞爬行类中,胚胎发育所需的钙通常主要由蛋黄和蛋清提供,蛋壳仅提供了10%~40%<sup>[8-9]</sup>;在龟鳖类和鳄类中,胚胎发育所需的钙则主要由卵壳提供,占50%~80%<sup>[1,10-11]</sup>,在鸟类中,蛋壳提供的钙可达89%<sup>[12]</sup>。该研究中中华草龟胚胎发育所需的钙65.5%由蛋壳提供,34.5%由蛋黄和蛋清提供,蛋壳是胚胎发育主要的钙源。该研究中胚胎发育中钙的来源蛋与由文辉等<sup>[6]</sup>、郑荣泉等<sup>[13]</sup>关于中华草龟的研究结果较为一致,蛋壳对胚胎发育钙的贡献与鳄龟(56%)、太平洋丽龟(60%)较为接近<sup>[1,14]</sup>,低于棱皮龟(75%)<sup>[15]</sup>。胚胎发育中钙吸收还受到孵化温度等环境因素的影响,适宜的孵化温度(27~30℃)可以提高中华草龟胚胎能量利用效率,促进钙等矿物元素的吸收,过高或过低的孵化温度都不利于胚胎发育过程中钙的吸收<sup>[13,15]</sup>。

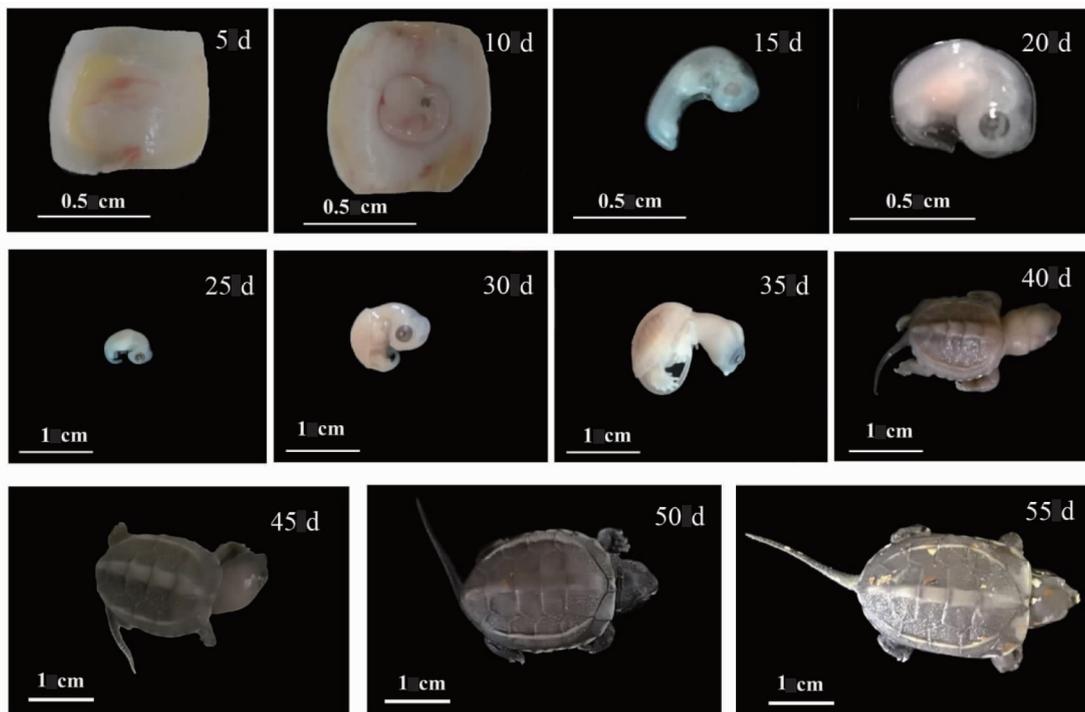


图 2 中华草龟胚胎发育过程

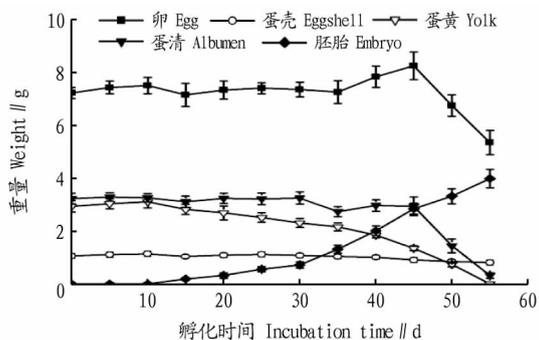
Fig.2 The embryonic development process of *C.reevesii*

图 3 孵化期间卵及各组分重量的变化

Fig.3 Weight variations of egg and its components during the incubation period

在中华草龟胚胎发育过程中,蛋清、蛋黄和蛋壳为胚胎提供钙的数量和时间不同。孵化中前期,胚胎中钙含量较低,蛋清、蛋黄及蛋壳中钙含量的变化较小。Cherille 等<sup>[16]</sup>向发育初期的火鸡蛋中注射<sup>45</sup>Ca 进行放射性分析,证实了在胚胎发育前半阶段蛋黄是胚胎发育的主要钙源。孵化中后期,胚胎增长迅速,龟背和龟甲等组织开始钙化,胚胎钙含量呈指数增加,蛋清和蛋黄中的钙快速下降,但蛋清和蛋黄中钙的减少量远小于胚胎中钙的增加量,表明蛋壳成为胚胎发育的主要钙源。孵化的中后期,蛋清中的钙迅速下降,直至消失殆尽,而蛋黄中钙下降则相对缓慢,还出现过明显的增加,可能是因为蛋黄具有富集钙的功能,能够富集尿囊绒膜从蛋壳中转运来的钙,供胚胎发育。蛋黄对钙的富集作用在鹌鹑<sup>[17]</sup>、棱皮龟<sup>[15]</sup>等动物中均有报道。

龟鳖类胚胎发育过程中对蛋壳中钙的吸收,除了补充自身所需钙外,还会降低蛋壳中钙含量,改变碳酸钙晶体结构,

促使蛋壳变薄、脆性增大、蛋壳壳单位间之间空隙增大,易与壳膜分离,有利于稚龟的出壳<sup>[18]</sup>。Cox 等<sup>[19]</sup>认为,除了胚胎吸收之外,孵化介质中水分与空气中的 CO<sub>2</sub> 相互作用对蛋壳中钙的浸出和微生物分解等外界因素造成蛋壳中钙的流失,也对孵化期蛋壳结构的变化也起到重要作用。该研究中中华草龟孵化前、后蛋壳中钙减少 21.9%,其中仅有 17.8%为胚胎发育所吸收,低于由文辉等<sup>[6]</sup>的研究结果(42.1%)。蛋壳中未被吸收的钙,可能是孵化期间与空气中 CO<sub>2</sub> 及水的相互作用或与孵化盘中的酸相互作用而从壳中浸出而流失<sup>[12]</sup>。Bilinski 等<sup>[20]</sup>对比了棱皮龟正常发育的受精卵和未受精的卵在经历孵化周期后卵壳钙含量变化,发现正常发育龟卵的卵壳钙减少 42.9%,而未受精的龟卵的蛋壳中钙也减少了 25.7%,孵化温度、湿度等环境条件均会影响孵化过程中钙的损失率。

综上所述,中华草龟胚胎发育过程中的钙由蛋壳、蛋黄和蛋清共同提供。发育中前期,胚胎中钙增长较慢,主要由蛋黄和蛋清提供钙;发育中后期,胚胎开始钙化,钙需求量迅速增加,蛋壳成为胚胎发育的主要钙源,这一阶段蛋黄有富集蛋壳钙的功能。孵化期间蛋黄和蛋清中的钙全部被胚胎吸收,占胚胎总钙含量的 34.5%,其余由蛋壳提供,蛋壳中减少的钙仅少部分被胚胎发育吸收,大部分流失。

#### 参考文献

- [1] SAHOO G, SAHOO R K, MOHANTY-HEJMADI P. Calcium metabolism in olive ridley turtle eggs during embryonic development [J]. *Comp Biochem Physiol Part A*, 1998, 121(1): 91-97.
- [2] 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.

- sis[J].Annals of clinical microbiology and antimicrobials,2020,19(1):1-8.
- [11] WAGENER K,PRUNNER I,POTHMANN H,et al.Diversity and health status specific fluctuations of intrauterine microbial communities in postpartum dairy cows[J].Veterinary microbiology,2015,175(2/3/4):286-293.
- [12] BOLGER A M,LOHSE M,USADEL B.Trimmomatic:A flexible trimmer for Illumina sequence data[J].Bioinformatics,2014,30(15):2114-2120.
- [13] REYON D, TSAI S Q, KHAYTER C, et al.FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing[J].Nature biotechnology,2012,30(5):460-465.
- [14] EDGAR R C.UPARSE:Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J].Nature methods,2013,10(10):996-998.
- [15] QUAST C, PRUESSE E, YILMAZ P, et al.The SILVA ribosomal RNA gene database project:Improved data processing and web-based tools[J].Nucleic acids research,2013,41:D590-D596.
- [16] DESANTIS T Z, HUGENHOLTZ P, LARSEN N, et al.GreenGenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB[J].Applied & environmental microbiology,2006,72(7):5069-5072.
- [17] CAPORASO J G, BITTINGER K, BUSHMAN F D, et al.PyNAST:A flexible tool for aligning sequences to a template alignment[J].Bioinformatics,2010,26(2):266-267.
- [18] 蒋微,张坤琳,王静,等.奶牛生殖道微生态学的研究进展[J].饲料广角,2013(8):36-37.
- [19] 陈晴,樊尚荣.非培养法检测阴道微生态的进展[J].医学综述,2012,18(15):2467-2470.
- [20] 刘勋.基于高通量测序的健康与子宫内炎症奶牛阴道菌群差异性研究[D].长春:吉林农业大学,2015.
- [21] 李红梅,白林,姜冬梅,等.基于16SrDNA高通量测序方法检测猪舍空气微生物多样性[J].中国畜牧杂志,2015,51(3):81-84.
- [22] 刘超逊.健康与患子宫内炎症水牛子宫内细菌组的比较分析[D].南宁:广西大学,2013.
- [23] 彭宇.体外培养和分子生物学技术研究奶牛产后子宫内菌群的动态变化[D].南京:南京农业大学,2011.
- [24] SANTOS T M A, GILBERT R O, BICALHO R C. Metagenomic analysis of the uterine bacterial microbiota in healthy and metritic postpartum dairy cows[J].Journal of dairy science,2011,94(1):291-302.
- [25] BICALHO M L S, SANTIN T, RODRIGUES M X, et al. Dynamics of the microbiota found in the vaginas of dairy cows during the transition period: Associations with uterine diseases and reproductive outcome[J].Journal of dairy science,2017,100(4):3043-3058.
- [26] 冉晓霞,蔡蕾,马芳,等.宫腔菌群与常见子宫内炎症及妊娠研究进展[J].现代妇产科进展,2019,28(2):149-150.
- [27] KUBYSHKIN A V, ALIEV L L, FOMOCHKINA I I, et al. Endometrial hyperplasia-related inflammation: Its role in the development and progression of endometrial hyperplasia[J].Inflammation research,2016,65(10):785-794.
- [28] CHEN L M, XU Y S, CHEN X Y, et al. The maturing development of gut microbiota in commercial piglets during the weaning transition [J/OL]. Frontiers microbiology,2017,8[2020-03-26].https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01688.
- [29] 黄安妮,闫鹤.患子宫内炎症母猪阴道菌群变化与发病关系研究[J].中国兽医杂志,2019,55(2):19-22.

(上接第105页)

- [3] ORŁOWSKI G, HALUPKA L, POKORNY P, et al. The effect of embryonic development on metal and calcium content in eggs and eggshells in a small passerine[J].IBIS,2016,158(1):144-154.
- [4] 朱学峰.广西中华草龟遗传多样性的RAPD分析[J].南方农业学报,2011,42(9):1148-1150.
- [5] WEBER C, ZHOU Y J, LEE J G, et al. Temperature-dependent sex determination is mediated by pSTAT3 repression of *Kdm6b* [J].Science,2020,368(6488):303-306.
- [6] 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.
- [7] 梁艺馨,刘康书,蔡秋,等.连续光源火焰原子吸收光谱法同时测定蓝莓中Ca、Mg、Fe、Zn含量[J].食品科学,2015,36(20):135-138.
- [8] JENKINS N K, SIMKISS K. The calcium and phosphate metabolism of reproducing reptiles with particular reference to the adder (*Vipera berus*) [J].Comp Biochem Physiol,1968,26(3):865-876.
- [9] PACKARD M Y, PACKARD G C, MILLER J D, et al. Calcium mobilization, water balance, and growth in embryos of the agamid lizard *Amphibolurus barbatus* [J].J Exp Zool,1985,235(3):349-357.
- [10] JENKINS N K. Chemical compositions of the eggs of the crocodile (*Crocodylus novaeguineae*) [J].Comp Biochem Physiol A,1975,51(4):891-895.
- [11] PACKARD M J, PACKARD G C. Sources of calcium, magnesium, and phosphorus for embryonic softshell turtles (*Trionyx spiniferus*) [J].J Exp Zool,1991,258(2):151-157.
- [12] 吕秀芬,高景芝,李春林.鸡胚胎发育过程中钙、镁含量的变化[J].首都师范大学学报(自然科学版),1999,20(3):66-68.
- [13] 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.
- [14] PACKARD M J, SHORT T M, PACKARD G C, et al. Sources of calcium for embryonic development in eggs of the snapping turtle *Chelydra serpentina* [J].J Exp Zool,1984,230(1):81-87.
- [15] BILINSKI J J, REINA R D, SPOTILA J R, et al. The effects of nest environment on calcium mobilization by leatherback turtle embryos (*Dermochelys coriacea*) during development [J].Comp Biochem Physiol Part A,2001,130(1):151-162.
- [16] CHERILLE N, 王春霞.火鸡胚胎发育后期及出雏后卵黄囊中钙含量的变化[J].国外畜牧科技,1992,19(4):6-7.
- [17] 邹发生,陈云霜,王培潮.鹌鹑胚胎发育过程中蛋内钙、镁含量的变化[J].动物学报,1996,42(3):334-336.
- [18] 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.
- [19] COX D L, KOOB T J, MECHAM R P, et al. External incubation alters the composition of squamate eggshells [J].Comp Biochem Physiol Part B,1984,79(3):481-487.
- [20] BILINSKI J J, REINA R D, SPOTILA J R, et al. The effects of nest environment on calcium mobilization by leatherback turtle embryos (*Dermochelys coriacea*) during development [J].Comp Biochem Physiol Part A,2001,130(1):151-162.