

孵化温度与性别对乌龟幼体大小和生长的影响

杜卫国*, 沈建伟, 胡凌君, 王磊

(杭州师范大学生命与环境科学学院, 杭州 310036)

摘要:以温度依赖型性别决定(TSD)物种乌龟(*Chinemys reevesii*)为对象,应用17 β -雌二醇和芳香化酶抑制剂Fadrozole处理26、28和30℃条件下孵化的卵,抑制孵化温度对后代性别的作用,获得性别逆转幼体。通过比较幼体形态、游泳能力和生长特征的孵化温度和性别间差异,检验TSD适应意义的Charnov-Bull假设。雌雄幼体的孵化期因孵化温度不同而不同,在26℃条件下,雄性幼体的孵化期长于雌性幼体,而在28和30℃条件下,孵化期则无两性差异。幼体大小与孵化温度和性别有关。低温幼体大于高温幼体,雌性幼体大于雄性幼体。幼体的游泳能力既不受孵化温度的影响,也无两性差异。幼体生长与孵化温度无关,但存在两性差异,雌体生长速度显著快于雄体。Charnov-Bull假设预测,TSD Ia型物种的高温雌体适合度应高于低温雌体,而高温雄体适合度则应低于低温雄体。研究结果与上述预测不符,故不支持该假设。

关键词:乌龟; Charnov-Bull 假设; 幼体; 孵化温度; 温度依赖型性别决定

Temperature and sex effects on size and growth of hatchlings in the Chinese three-keeled pond turtle (*Chinemys reevesii*)

DU Weiguo*, SHEN Jianwei, HU Lingjun, WANG Lei

School of Life and Environmental Sciences, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, China

Abstract: The Charnov-Bull hypothesis has been widely accepted to explain the adaptive significance of temperature-dependent sex determination (TSD), but empirical support for this hypothesis is still limited. Eggs of the Chinese three-keeled pond turtle (*Chinemys reevesii*) were incubated at 26 °C, 28 °C, and 30 °C, and treated with 17 β -estradiol or Fadrozole (an aromatase inhibitor) to obtain both normal and sex-reversed hatchlings at each temperature. Our objectives were to test the Charnov-Bull hypothesis by assessing the influence of incubation temperature and sex on hatchling traits. Incubation duration was longer in males than females at 26 °C, but did not differ between the sexes at 28 °C and 30 °C. Hatchlings from low temperatures were larger than those from high temperatures, and females were larger than males. The swimming capacity of hatchlings was not affected by either incubation temperature or sex. Hatchling growth was not influenced by incubation temperature, but differed between the sexes. Females grew faster than males. The Charnov-Bull hypothesis predicts that in the male-female pattern of TSD, females from high temperatures should have higher fitness than those from low temperatures and/or that males from high temperatures should have lower fitness than those from low temperatures. Our results are inconsistent with this prediction and thus give no support to this hypothesis.

Key Words: Chinese three-keeled pond turtle (*Chinemys reevesii*); Charnov-Bull hypothesis; Hatchling; Incubation temperature; temperature-dependent sex determination

脊椎动物的性别决定有环境决定型(Environmental sex determination, ESD)和基因决定型(Genotypic sex determination, GSD)两种模式^[1]。爬行动物 ESD 主要为温度依赖型性别决定模式(Temperature-dependent sex

基金项目:浙江省自然科学基金青年团队资助项目(R5080004)

收稿日期:2009-05-30; 修订日期:2009-11-09

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: dwghz@126.com

determination, TSD)。自 20 世纪 50 年代首次在爬行动物中发现 TSD 以来,已探明爬行动物中的所有鳄类、大部分龟鳖类及少数蜥蜴具 TSD,但其适应意义仍存在争议^[1-3]。在 TSD 适应意义的理论解释中,Charnov-Bull 假设最具说服力^[3-4]。该假设认为,如果雌雄后代的适合度因环境不同而不同,特定温度条件下孵出的某一性别后代在该环境下适合度最大,其适合度应高于其他温度条件下孵出的同性个体及该温度条件下的异性个体。例如,在高温诱导雌体,低温诱导雄体的 TSD Ia 模式中,高温雌体适合度应高于低温雌体,高温雄体的适合度则低于低温雄体。

检验 Charnov-Bull 假设,存在两个技术难题。第一,在 TSD 种类中,特定温度条件下常产生单一性别的后代,其适合度变异是性别和温度共同作用的结果。如何区分后代适合度变异中性别和温度的独立作用是困扰 TSD 研究的一个难题。20 世纪末,TSD 生理机制研究发现,孵化温度影响胚胎促性激素生成酶和性激素分泌而决定幼体性别^[5]。当向卵施加外源雌激素(如 17 β -雌二醇)时,在原本产生雄体的温度条件下可孵出雌体;相反,当施加芳香化酶抑制剂时,在原本产生雌体的温度条件下可孵出雄体^[5-6]。该项激素调控性别技术为 TSD 适应意义研究提供了新方法。第二,由于大多数 TSD 爬行动物(如鳄、龟)的生活史周期长,测定其后代适合度的难度很大。常用的研究方法是测定此类动物适合度的间接指标,如个体大小、运动能力、生长等一些与适合度紧密相关的幼体表型特征^[6]。由于上述技术困难,有关 TSD 适应意义理论假设的实验检验尚极为有限。迄今,应用激素调控技术逆转幼体性别并检验后代适应度的研究仅见于北美蛇龟(*Chelydra serpentina*)和澳大利亚杰克鬣蜥(*Amphibolurus muricatus*)^[6-8]。

乌龟(*Chinemys reevesii*)为 TSD Ia 型物种,低温条件下雄性后代比例偏高,高温条件下雌性后代比例较高^[9]。本研究在 26、28℃ 和 30℃ 恒温条件下孵化乌龟卵,应用 17- β 雌二醇和芳香化酶抑制剂 Fadrozole 抑制温度效应,同时获得自然和性别逆转的后代。通过比较不同温度条件下同一性别后代的表型特征,检验 Charnov-Bull 假设。

1 材料和方法

1.1 实验设计

本研究采用 3(激素) $\times$ 3(温度)的因子实验设计。3 个激素处理分别为对照,17- β 雌二醇和芳香化酶抑制剂 Fadrozole;3 个温度处理分别为 26、28℃ 和 30℃。

1.2 龟卵的收集与孵化

实验用乌龟卵购自海宁龙头阁龟鳖养殖场。卵称重和编号后随机分配到各处理中,卵平均重量为(8.27 $\pm$ 0.08)g(范围:4.56—10.74g)。卵白斑朝上半埋于内含潮湿基质(-220kPa,干蛭石:水=1:1)的孵化盒中。孵化盒分别置于 26、28℃ 和 30℃ 的人工气候箱(宁波莱福科技有限公司),隔日补充孵化基质散失的水分,以保持基质湿度恒定。孵化过程中按顺序调整培养箱中的孵化盒位置,以减少箱内温梯度的影响。

1.3 激素处理

在第 18 天(30℃)、20 天(28℃)和 23 天(26℃)分别对卵进行激素处理,雌二醇激素组卵滴加溶于 5 μ L 酒精中的 15 μ g 17 β 雌二醇(Sigma 公司),Fadrozole 组卵滴加溶于 5 μ L 酒精中的 100 μ g 芳香化酶抑制剂 Fadrozole(CGS016949A, Novartis 医药公司),而对照组卵仅滴加 5 μ L 酒精^[6]。

1.4 幼体大小和生长的测定

孵化期和幼体大小:孵化期为卵入孵时间至幼体破壳时间的间隔。待幼体开始出壳,每天检查孵化盒 3 次,收集新生幼体,随即测定其体重及背甲长与宽。

运动能力:幼体孵出的第 2 天,在 1m 长的直形泳道内测定其游泳能力。该实验在(30 $\pm$ 0.5)℃ 的恒温室内进行,以减少体温差异导致的运动能力变异。实验开始前,预先将动物置于恒温室内适应 2h,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,随后分析行为录像,测定 25cm 距离内的游泳速度。

生长:测定运动能力后,幼体剪甲编号饲养于(29 $\pm$ 1)℃ 的恒温水池内,每天全池给食足量龟鳖颗粒饲

料,至第6月与第12月,根据两性形态差异鉴别幼体的性别,并称取动物体重。幼体生长速率以12个月内的日增重量表示。

1.5 数据处理

应用 Statistics6.0 软件统计数据。检验数据的正态性 (Kolmogorov-Smirnov 检验) 和方差同质性 (Bartlett 检验), 数据符合参数分析条件。应用单因子方差分析 (ANOVA) 比较性别逆转与自然个体的特征差异, 用双因子方差分析检测孵化温度和性别对孵化期、运动能力及生长速率的影响, 用协方差分析 (ANCOVA, 初始卵重为协变量) 检测孵化温度和性别对幼体大小与重量的影响; 用重复测量方差分析检验孵化温度和性别对幼体成长过程中体重的影响。描述性统计值用平均值 $\pm$ 标准误表示, 显著性水平设置为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 激素处理对后代特征的影响

通过比较 28℃ 条件下 17- β 雌二醇处理组的性别逆转雌性幼体与对照组雌体, 以及 Fadrozole 处理组的性别逆转雄体与对照组雄体, 发现上述激素处理对卵孵化期, 幼体形态特征和生长无显著影响 (表 1)。

表 1 17- β 雌二醇和 Fadrozole 激素处理对乌龟幼体表型特征的影响

Table 1 The effects of 17 β -estradiol and Fadrozole on phenotypic traits of hatchling *Chinemys reevesii*

	自然雌体 Natural females (<i>n</i> = 19)	激素处理雌体 17 β -estradiol treated females (<i>n</i> = 29)	17- β 雌二醇效应 17 β -estradiol effect	自然雄体 Natural males (<i>n</i> = 13)	激素处理雄体 Fadrozole treated males (<i>n</i> = 10)	Fadrozole 效应 Fadrozole effect
卵重/g Egg mass	5.47 $\pm$ 0.20	5.42 $\pm$ 0.15	$F_{1,46} = 0.14$, $P = 0.71$	8.11 $\pm$ 0.29	8.26 $\pm$ 0.37	$F_{1,21} = 0.10$ $P = 0.76$
孵化期/d Incubation duration	60.7 $\pm$ 0.7	59.2 $\pm$ 0.8	$F_{1,46} = 1.58$ $P = 0.22$	57.7 $\pm$ 0.9	60.4 $\pm$ 1.7	$F_{1,21} = 2.34$ $P = 0.14$
背甲长/mm Carapace length	27.6 $\pm$ 0.4	27.8 $\pm$ 0.4	$F_{1,46} = 0.17$ $P = 0.68$	27.8 $\pm$ 0.4	27.0 $\pm$ 0.8	$F_{1,21} = 0.80$ $P = 0.38$
背甲宽/mm Carapace width	22.4 $\pm$ 0.3	22.4 $\pm$ 0.2	$F_{1,46} = 0.001$ $P = 0.97$	22.5 $\pm$ 0.5	21.8 $\pm$ 0.6	$F_{1,21} = 0.91$ $P = 0.35$
幼体重量/g Hatchling mass	5.47 $\pm$ 0.20	5.42 $\pm$ 0.15	$F_{1,46} = 0.04$ $P = 0.84$	5.51 $\pm$ 0.29	5.23 $\pm$ 0.40	$F_{1,21} = 0.33$ $P = 0.57$
泳速/(mm/s) Swimming speed	52.7 $\pm$ 5.9	61.1 $\pm$ 3.7	$F_{1,46} = 1.64$ $P = 0.21$	65.5 $\pm$ 6.9	66.8 $\pm$ 4.6	$F_{1,21} = 0.02$ $P = 0.88$
生长速率/(g/d) Growth rate	0.61 $\pm$ 0.04	0.56 $\pm$ 0.04	$F_{1,46} = 0.85$ $P = 0.36$	0.28 $\pm$ 0.02	0.28 $\pm$ 0.02	$F_{1,21} = 0.00$ $P = 0.99$

注: 比较 28℃ 条件下激素处理组的性别逆转幼体与对照组幼体的特征, 以检测 17- β 雌二醇和 Fadrozole 效应

2.2 孵化温度和性别对孵化期的影响

孵化温度显著影响孵化期。孵化温度和性别对孵化期存在交互作用, 表明雌雄乌龟的孵化期在不同孵化温度下不尽相同 (表 2)。在 26℃ 条件下, 雄体具有较长的孵化期 ($F_{1,75} = 10.20$, $P = 0.002$); 而在 28℃ ($F_{1,82} = 3.07$, $P = 0.08$) 和 30℃ ($F_{1,63} = 0.83$, $P = 0.37$) 条件下, 孵化期不存在两性差异 (图 1)。

2.3 孵化温度和性别对幼体大小及运动能力的影响

入孵卵的平均重量不存在处理间差异, 后代性别与卵大小无关 (表 2)。幼体重量和大小 (背甲长与宽) 不仅受孵化温度的显著影响, 而且存在明显的两性差异 (表 2)。低温条件下孵出的幼体个体较高温幼体大而重, 雌性幼体大于雄性幼体。与之相反, 孵化温度和性别对幼体的游泳能力则无显著影响 (表 2, 图 2)。

2.4 孵化温度和性别对幼体生长的影响

幼体的生长速率不受孵化温度影响, 但存在明显的雌雄差异 (表 2)。在第 6 月和第 12 个月, 幼体体重与孵化温度无关 ($F_{2,220} = 1.48$, $P = 0.23$), 但存在显著的两性差异 ($F_{1,220} = 98.08$, $P < 0.0001$), 雌体体重大于雄体 (图 3)。此外, 孵化温度和性别的交互作用对其体重增长影响不显著 ($F_{2,220} = 0.34$, $P = 0.72$)。

表 2 孵化温度和性别对卵重量、孵化期及幼体表型特征作用的双因子方差或协方差分析结果

Table 2 Two-way ANOVA or ANCOVA results of the effects of temperature and sex on incubation duration and hatchling phenotypic traits in the three-keeled pond turtle, *Chinemys reevesii*

	孵化温度 Incubation temperature	性别 Sex	交互作用 Temperature Sex
孵化期 Incubation duration	$F_{2,220} = 78.0$ $P < 0.0001$	$F_{1,220} = 0.03$ $P = 0.85$	$F_{2,220} = 5.91$ $P = 0.003$
卵重 Egg mass	$F_{2,220} = 0.36$ $P = 0.70$	$F_{1,220} = 0.84$ $P = 0.36$	$F_{2,220} = 0.23$ $P = 0.79$
幼体重量 Hatchling mass	$F_{2,219} = 8.57$ $P < 0.001$	$F_{1,219} = 5.81$ $P = 0.02$	$F_{2,219} = 1.83$ $P = 0.16$
背甲长 Carapace length	$F_{2,219} = 4.55$ $P = 0.012$	$F_{1,219} = 5.11$ $P = 0.024$	$F_{2,219} = 0.96$ $P = 0.38$
背甲宽 Carapace width	$F_{2,219} = 10.18$ $P < 0.001$	$F_{1,219} = 9.07$ $P = 0.003$	$F_{2,219} = 2.73$ $P = 0.07$
泳速 Swimming speed	$F_{2,220} = 1.53$ $P = 0.22$	$F_{1,220} = 0.91$ $P = 0.34$	$F_{2,220} = 1.69$ $P = 0.19$
生长速率 Growth rate	$F_{2,220} = 1.33$ $P = 0.27$	$F_{1,220} = 137.06$ $P < 0.0001$	$F_{2,220} = 0.55$ $P = 0.58$

3 讨论

前期乌龟卵孵化研究测定了温度对胚胎发育以及幼体形态特征、功能表现和生长的影响,发现高温下孵出的幼体较低温幼体小,但生长较快^[9-12]。但是,由于高温幼体为雌体,低温幼体则为雄体,上述温度处理间的差异可能是直接的孵化温度效应,亦可能仅为幼体性别间的差异。传统的孵化实验无法阐明温度和性别效应对后代表型变异的贡献,本研究应用激素改变后代性别,能够在相同温度条件下比较雌雄后代的特征差异,进而揭示了温度和性别的独立效应。本文结果显示低温孵出的幼体大于高温幼体,同一温度条件下,雌性幼体大于雄性幼体(图 2)。因此,低温雄性幼体大于高温雌性幼体的现象符合孵化温度效应,但与两性差异相反。低温条件下孵出较大幼体亦在一些 GSD 龟类中发现,如中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)^[13]。此外,还发现幼体生长速率只存在显著的两性差异,而不受孵化温度的影响(表 2)。因此,高温孵出幼体生长快于低温孵出幼体并非孵化温度的直接效应,而是生长效率两性差异所致。

本研究应用激素调控后代性别,旨在评估温度和性别对后代表型特征的影响,检验 Charnov-Bull 假设。此类实验引入了一个新的影响因子——激素操纵。激素操纵本身是否影响后代的生理特征? 本研究结果表明,激素处理获得的性别逆转个体与自然个体的表型特征无显著差异(表 1),其他类似研究也获得相同结论^[6-7,14]。因此,激素操纵不会混淆温度与性别效应,能鉴别温度和性别对后代表型的贡献,可用于检验 TSD 适应意义的相关理论假设。

根据 Charnov-Bull 假设,高温孵化条件下乌龟雌性后代的适合度应高于低温雌体,相反,高温条件下的乌龟雄性后代应低于低温雄体。爬行动物幼体大小、运动能力和生长等表型特征与幼体适合度成正相关^[15-17]。由此可预测,若 Charnov-Bull 假设成立,高温乌龟雌体的大小、运动能力和生长速率应大于低温雌体,高温乌龟雄体的大小、运动能力和生长速率应小于低温雄体。然而,本研究结果显示,尽管孵化温度可影响幼体大小,但其影响模式在雌雄幼体中一致,均表现为高温条件下孵出较小的幼体。此外,孵化温度对运动能力和生长速度无显著影响,即高低温下孵出同性别后代不存在运动能力和生长速度的差异。由此可见,高温雌龟和低温雄龟的表型特征并不优于其他温度条件下的同性别个体。因此,本研究结果与 Charnov-Bull 假设的预测不符。

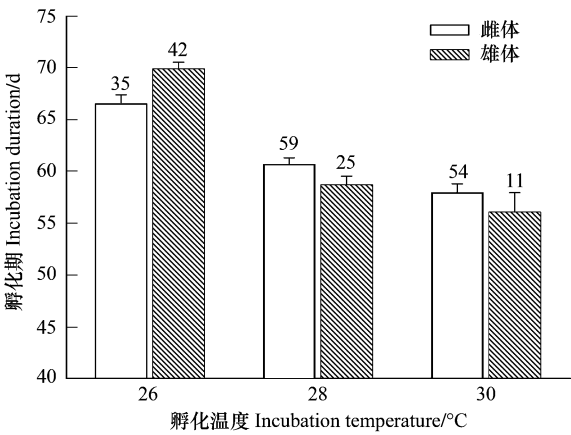


图 1 孵化温度和幼体性别对乌龟卵孵化期的影响
Fig. 1 The effects of incubation temperature and hatchling sex on incubation duration in the Chinese three-keeled pond turtle (*Chinemys reevesii*)

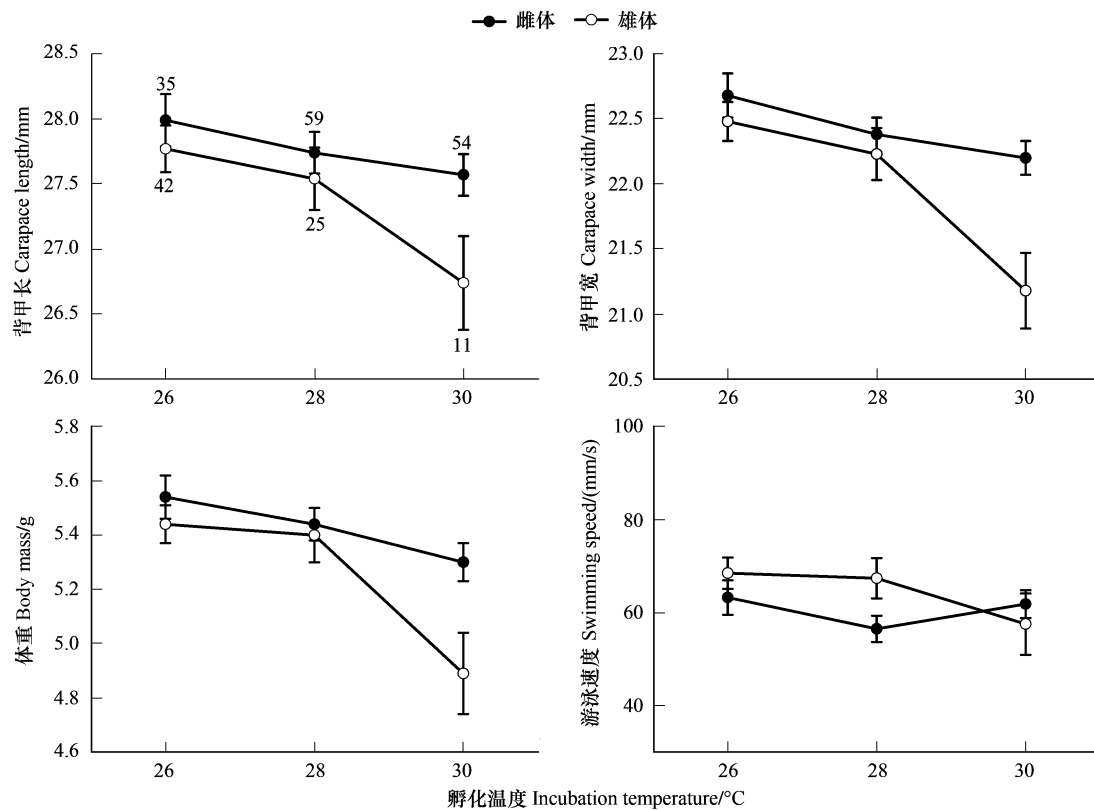


图2 不同温度条件下孵出的雌雄乌龟幼体的大小及游泳能力

Fig. 2 The size and swimming capacity of male and female hatchlings (*Chinemys reevesii*) from different incubation temperatures

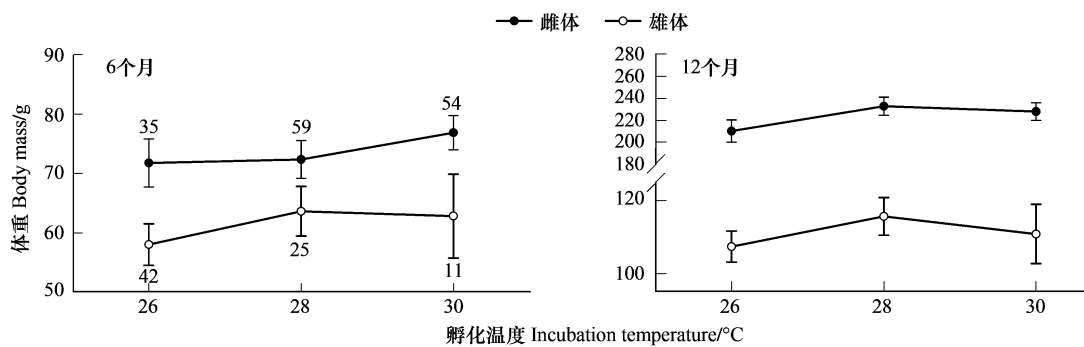


图3 不同温度条件下孵出的雌雄乌龟幼体的生长

Fig. 3 The growth of male and female hatchling turtles (*Chinemys reevesii*) from different incubation temperatures

纵览应用 TSD 爬行动物验证该假设的实验证据,结论并不一致。一些学者的研究结果不支持 Charnov-Bull 假设^[18-19],而另一些研究结果则符合 Charnov-Bull 假设的预测^[6-7]。而且,即使来自同物种的研究证据,亦存在争议。譬如,Rhen 和 Lang^[6]报道群体饲养的美洲蛇鳄龟的胚后生长受孵化温度的显著影响,支持 Charnov-Bull 假设;而 Steyermark 和 Spotila^[20]则发现单独饲养的美洲蛇鳄龟的胚后生长与孵化温度无关,不支持该假设。由此可见,有关 Charnov-Bull 假设的实验验证,结果有限且不统一,尚待在更多的 TSD 物种中开展此类工作和期待融入新的理论和实验技术^[21]。

由于大部分 TSD 物种的寿命较长,实验验证 Charnov-Bull 假设的最大技术难题在于测定此类物种的适合度。最近,一些学者以寿命较短的澳大利亚杰克鬣蜥为对象,测定雌雄后代适合度(存活率和繁殖成功率),为 Charnov-Bull 假设提供了实验证据^[7]。然而,类似的研究在龟等长寿动物中尚未见报道。目前,在自然条

件下测定龟的终生适合度尚存在很大困难,如何克服该技术障碍,测定此类长寿动物后代的适合度,依然是生态学家在爬行动物 TSD 适应意义研究中面临的重要挑战和努力的方向。

致谢:冯佳华、朱灵君参加部分卵孵化和幼体运动能力的测试工作,Novartis 医药公司提供 Fadrozole,浙江湖州上跃龟鳖苗种有限公司在幼体生长实验中提供帮助,谨表谢意。

References:

- [1] Valenzuela N, Lance V. Temperature Dependent Sex Determination in Vertebrates. Washington D. C. : Smithsonian Books, 2004: 11-58.
- [2] Janzen F J, Paukstis G L. Environmental sex determination in reptiles: ecology, evolution, and experimental design. Quarterly Review of Biology, 1991, 66 (2):149-179.
- [3] Charnov E L, Bull J J. When is sex environmentally determined?. Nature, 1977, 266 (5606):828-830.
- [4] Shine R. Why is sex determined by nest temperature in many reptiles?. Trends in Ecology & Evolution, 1999, 14 (5):186-189.
- [5] Crews D. Temperature-dependent sex determination: The interplay of steroid hormones and temperature. Zoological Science, 1996, 13 (1):1-13.
- [6] Rhen T, Lang J W. Phenotypic plasticity for growth in the common snapping turtle: effects of incubation temperature, clutch and their interaction. American Naturalist, 1995, 146 (5):726-747.
- [7] Warner D A, Shine R. The adaptive significance of temperature-dependent sex determination in a reptile. Nature, 2008, 451 (7178):566-568.
- [8] Warner D A, Shine R. The adaptive significance of temperature-dependent sex determination: Experimental tests with a short-lived lizard. Evolution, 2005, 59 (10):2209-2221.
- [9] Du W G, Hu L J, Lu J L, Zhu L J. Effects of incubation temperature on embryonic development rate, sex ratio and post-hatching growth in the Chinese three-keeled pond turtle, *Chinemys reevesii*. Aquaculture, 2007, 272 (1/4):747-753.
- [10] Du W G, Zheng R Q, Shu L. The influence of incubation temperature on morphology, locomotor performance and cold tolerance of hatchling Chinese three-keeled pond turtle, *Chinemys reevesii*. Chelonian Conservation and Biology, 2006, 5 (2):294-299.
- [11] Wang P C, Ma W, Lu B, You W H. Studies on ecology of incubation of eggs of *Chinemys reevesii*. Herpetological Series, 1990, 1:113-119.
- [12] Zheng R Q, Du W G, Zhang Y P, Bao Y X. Influence of incubation temperature on embryonic use of energy and mineral metabolism in the Chinese three-keeled pond turtle *Chinemys reevesii*. Acta Zoologica Sinica, 2006, 52 (1):21-27.
- [13] Du W G, Ji X. The effects of incubation thermal environments on size, locomotor performance and early growth of hatchling soft-shelled turtles, *Pelodiscus sinensis*. Journal of Thermal Biology, 2003, 28 (4):279-286.
- [14] Wennstrom K A, Crews D. Making males from females: the effects of aromatase inhibitors on a parthenogenetic species of whiptail lizards. General and Comparative Endocrinology, 1995, 99 (3):316-322.
- [15] Janzen F J. An experimental analysis of natural selection on body size of hatchling turtles. Ecology, 1993, 74 (2):332-341.
- [16] Ferguson G W, Fox S F. Annual variation of survival advantage of large juvenile side-blotched lizards, *Uta stansburiana*: its causes and evolutionary significance. Evolution, 1984, 38 (2):342-349.
- [17] Sinervo B, Adolph S C. Thermal sensitivity of growth rate in hatchling Sceloporus lizards: environmental, behavioral and genetic aspects. Oecologia, 1989, 78 (3):411-419.
- [18] Morjan C L, Janzen F J. Nest temperature is not related to egg size in a turtle with temperature-dependent sex determination. Copeia, 2003, 2003 (2):366-372.
- [19] Janzen F J, Paukstis G L. A preliminary test of the adaptive significance of environmental sex determination in reptiles. Evolution, 1991, 45 (2):435-440.
- [20] Steyermark A C, Spotila J R. Effects of maternal identity and incubation temperature on snapping turtle (*Chelydra serpentina*) growth. Functional Ecology, 2001, 15 (5):624-632.
- [21] Janzen F J, Phillips P C. Exploring the evolution of environmental sex determination, especially in reptiles. Journal of Evolutionary Biology, 2006, 19 (6):1775-1784.

参考文献:

- [11] 王培潮, 马伟, 卢波, 由文辉, 乌龟卵孵化生态的研究. 蛇蛙研究丛书, 1990, 1: 113-119.
- [12] 郑荣泉, 杜卫国, 张永普, 鲍毅新. 孵化温度对乌龟胚胎能量利用及矿物质代谢的影响. 动物学报, 2006, 52(1):21-27.