

《重庆师范大学学报(自然科学版)》

“动物科学”栏目 2019 年合集

荆州碘泡虫寄生部位种群分化.....	王 茂, 赵元着, 高 磊, 杨承忠(2)
急性光周期紊乱对斑马鱼繁殖行为的影响.....	陈 鑫, 盛 尚, 江 涛, 刘智皓(10)
水体双酚 A 暴露对鲤肝肾的氧化胁迫及静止代谢率的影响.....	张江惠, 吴光洁, 唐婉琴, 袁伦强(15)
中国境内野生穿山甲现状及非法贸易概况.....	郭珊珊, 彭建军, 刘 双, 刘 萍(21)
鲫葡萄糖调节蛋白 78 基因部分序列的克隆、鉴定及功能预测.....	刘小花, 赵元着, 鄢彦杰, 张金叶(28)
低剂量镉暴露对雄性斑马鱼生殖内分泌的干扰.....	安晶晶, 谢冬梅, 李英文, 陈启亮(34)
短期捕食胁迫对中华倒刺鲃幼鱼行为特征的影响.....	易恋淳, 肖玲韬, 付世建, 付 成(40)
柞蚕微孢子虫基因组 LTR 反转座子鉴定与进化分析.....	周 俊, 石 鹏, 张 爽, 许金山, 张小燕(46)
10 种昆虫过氧化氢酶基因的全基因组鉴定与特征预测.....	张莉娟, 尹华春, 李 勃, 陈 斌(53)
基于微卫星标记的中华蜜蜂 5 个自然群体遗传多样性分析.....	张 爽, 周 俊, 胡 冲, 吕 言, 石 鹏, 许金山(61)
突伪叶甲亚科 5 个中国新纪录种记述.....	梁志红, 陈 斌(68)
沟伪叶甲属及其两个中国新纪录种记述.....	吴 涛, 陈 斌(73)
中国扇螳属一新纪录种.....	蒲徐波, 兰洪波, 于 昕(78)
透明时间对草鱼脂肪组织和肌肉组织石蜡切片制作效果的影响.....	李 影, 唐 蓓, 曾 瑛(81)
乙炔基雌二醇短期暴露损伤斑马鱼雌性成鱼渗透压调节.....	刘智皓, 兰雪溶, 李英文(86)
饥饿对鲫幼鱼静止代谢及个性行为的影响.....	凌 鸿, 曾令清(91)
颜色标记对鲫标准代谢率的影响.....	李若琳, 唐晴晴, 王 萌, 杨维佳, 曾令清(99)
白鹭基因组微卫星分布规律研究.....	黄 杰, 杨 波, 贾银平, 杨承忠(105)
单养与群养鲤幼鱼的静止代谢、游泳能力与生长性能.....	夏丹阳, 沈 聪, 李 倩, 朱晓玲, 罗毅平, 庞 旭(111)
低剂量镉对雌性斑马鱼生殖内分泌的影响.....	谢冬梅, 曾 征, 易循娥, 李英文, 陈启亮(116)

荆州碘泡虫寄生部位种群分化*

王茂, 赵元著, 高磊, 杨承忠

(重庆师范大学 生命科学学院 动物生物学重庆市重点实验室, 重庆 401331)

摘要:【目的】研究荆州碘泡虫(*Myxobolus kingchowensis*)寄生于同种宿主不同寄生部位的种群分化及系统发育关系。【方法】对荆州碘泡虫不同种群及相似物种的形态和它们18S rDNA序列的变异位点、相似度、遗传距离、AT碱基比进行比较,分析了它们的系统发育关系。【结果】荆州碘泡虫重庆胆囊种群、武汉肌肉种群和武汉肾脏种群的形态学特征基本一致。各种群18S rDNA序列相似度为98.8%~100.0%,遗传距离为0.000~0.009,变异位点数为3~12个,AT碱基比(53.29%)高于GC碱基比(46.71%)。荆州碘泡虫不同种群及相似物种的系统发育树分为两大枝,孢子前端平滑且钝圆的物种聚为一枝,孢子前端较尖的物种聚为了另一枝;鳃寄生的碘泡虫整体处于该系统发育树的基部。【结论】寄生于异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)上不同器官部位的荆州碘泡虫已出现种群分化;孢子形态上相似的碘泡虫物种具有更近的亲缘关系;较之于肌肉、肾脏、胆囊、骨骼肌、鳃和肠寄生的碘泡虫而言,鳃寄生碘泡虫分化较早。

关键词:荆州碘泡虫;18S rDNA;种群分化;寄生部位

中图分类号:Q958.9

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2019)01-0029-08

粘孢子虫(Myxosporidia)是一类个体微小、具危害性的后生动物(Metazoa)寄生虫,除极少数寄生于鸟类、哺乳类和环节动物(Annelida)外,通常寄生于变温脊椎动物,尤其是鱼类^[1-9]。到目前为止,世界上已被记录的粘孢子虫有2 200余种^[10]。碘泡科(Myxobolidae)是其中最大的一科,且含有丰富的物种^[11-12]。

碘泡虫(*Myxobolus*)可寄生于鱼体几乎所有部位,但是不同部位的寄生对鱼体的影响不同。例如:透镜碘泡虫(*Myxobolus lentisuturalis*)寄生于肌肉时可造成鱼类体表溃烂,而寄生于胆囊时则不会引起明显症状。吴李碘泡虫(*Myxobolus wulii*)寄生于金鱼(*Carassius auratus auratus*)的肝胰脏时可使鱼腹部膨大,结构遭到破坏;但寄生于鳃时,除鳃丝间充满包囊外,鱼体并未出现明显症状^[13]。上述现象暗示,这些寄生在宿主鱼不同部位的碘泡虫种群可能存在一定程度的分化。1973年李连祥和倪达书在采自湖北黄石花马湖的鲫(*Carassius auratus*)肌肉中发现了荆州碘泡虫(*Myxobolus kingchowensis*),但将它认作肌肉碘泡虫(*Myxobolus musculi*)。1998年陈启鏊和马成伦发现该物种的孢子前端较尖且极囊大小占孢子大小的2/3,而肌肉碘泡虫孢子呈椭圆形且极囊大小占孢子大小的1/2,因此认为它并非肌肉碘泡虫,并在中国动物志中将之重新命名为荆州碘泡虫。荆州碘泡虫的宿主除鲫外,还包括鲢(*Megalobrama terminalis*)、兴凯鲮(*Acheilognathus chankaensis*)、鳙(*Aristichthys nobilis*)等,且它的寄生部位呈现多样化^[14]。此前,对荆州碘泡虫仅有形态描述,直到2017年赵子明等人^[15]从武汉市蔡甸区池塘养殖的异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)肌肉与肾脏中再次发现荆州碘泡虫并首次提交了它的18S rDNA序列分子数据。为了深入了解荆州碘泡虫寄生于相同宿主不同寄生部位的种群分化情况,笔者对检获自嘉陵江重庆段异育银鲫胆囊中的该物种种群(以下简称胆囊种群)、武汉肌肉种群(以下简称肌肉种群)、武汉肾脏种群(以下简称肾脏种群)以及相似物种的形态和18S rDNA序列的相似度、遗传距离、变异位点、AT碱基比等进行了比较,最后对它们的系统发育关系进行了分析。

1 材料与方法

1.1 样本收集与物种鉴定

30条寄主鱼异育银鲫于2018年4月13号采自嘉陵江重庆段,在其中3尾鱼的胆囊里发现了荆州碘泡虫。

* 收稿日期:2018-07-03 修回日期:2018-09-12 网络出版时间:2019-01-09 7:38

资助项目:国家自然科学基金(No. 31471980; No. 31501845; No. 31672280);重庆市基础科学与前沿技术研究项目(No. cstc2017jcyjAX0165; No. cstc2018jcyjAX0738)

第一作者简介:王茂,女,研究方向为鱼类寄生虫学,E-mail: wangmao1313@163.com;通信作者:杨承忠,男,副教授,E-mail: drczyang@126.com

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20190109.0731.040.html>

参照文献[16]对样本进行处理和鉴定。

1.2 DNA 提取、扩增和测序

1.2.1 DNA 提取 用移液枪吸取胆囊里的粘孢子虫样本至 1.5 mL 离心管中,采用 Dneasy Tissue Kit (QIAGEN)试剂盒对样本基因组 DNA 进行提取,提取成功后保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱待用。

1.2.2 DNA 扩增与测序 对提取成功的样本基因组 DNA 进行 18S rDNA 序列片段扩增,扩增引物为 18E: 5'-CTGGTTGATCCTGCCAGT-3'和 18R: 5'-CTACGGAAACCTTGTTACG-3'^[17-18]。25 μL 的 PCR 反应体系,包括 5 μL Mix(上海英潍捷基生物公司),两种引物各 0.5 μL (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),6 ng 模板 DNA,用超纯水灭菌后补足至 25 μL 。反应程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 90 s;35 个循环的 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 20 s、56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 20 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。整个反应完成后扩增产物在 12 $^{\circ}\text{C}$ PCR 仪下保温。最后产物的检测、纯化与测序参照文献[19]进行。

1.3 序列和系统发育分析

将获得的荆州碘泡虫样本的 18S rDNA 序列在 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)中进行 BLAST 比对,并下载与之相似度较高的物种序列,其余碘泡虫物种序列根据碘泡科物种种类进行选取并下载,下载序列均以 FASTA 文件格式保存^[10]。用 MEGA 6.0 软件的 K2P 模型对本研究样本及与之高相似度序列之间的遗传距离进行计算,并使用在线软件 Pairwise Sequence Alignment (www.ebi.ac.uk/Tools/psa/)的 Global Alignment 计算两两序列间的相似度^[20]。结合 MEGA 6.0 和 Bioedit 软件分析不同序列间的变异位点和 AT 碱基比。最后利用在线软件 The CIPRES Science Gateway V. 3.3 (<http://www.phylo.org/>)中的 RAxML-HPC2 XSEDE (7.6.3)模式构建最大似然树(Maximum likelihood, ML),选择 100 次重复抽样进行 Bootstrap 检验;利用 MrBayes 3.1.2 软件中的 GTR 模式构建贝叶斯树(Bayesian inference, BI),运行 3 000 000 代,每 200 代抽样 1 次^[21]。系统发育树以鲑四囊虫(*Tetracapsuloides bryosalmonae*, Genbank 登录号:FJ981823)为外群,绘制软件为 FigTree v1.4.2 和 Photoshop^[22]。

2 结果

2.1 形态学重描述与鉴别

来自异育银鲫胆囊荆州碘泡虫的孢子壳面观卵形,前端略尖,后端钝圆,缝面观纺锤形;两个极囊呈茄形,大小不同,约占孢子大小的 2/3,极囊纵轴之间的夹角约为 39 $^{\circ}$ 。荆州碘泡虫的 3 个胆囊种群、肌肉种群(Genbank 登录号:KP400624)、肾脏种群(Genbank 登录号:KP400625)和原始描述种群^[14]的形态及大小最为接近。此外,与荆州碘泡虫形态上最为相似的种为阿拉巴哈德碘泡虫(*Myxobolus bhadrensis*, Genbank 登录号:KM029972)和吴李碘泡虫(Genbank 登录号:EF690300)^[13,23],但阿拉巴哈德碘泡虫孢子整体上比荆州碘泡虫小且孢子前端较圆,而吴李碘泡虫的孢子远大于荆州碘泡虫的孢子(表 1)。

2.2 18S rDNA 序列变异位点分析

研究结果显示:在 1 410 bp 共有 18S rDNA 序列长度上,荆州碘泡虫胆囊种群、肌肉种群及肾脏种群之间变异位点数为 3~12 个;荆州碘泡虫与阿拉巴哈德碘泡虫、肌肉碘泡虫(Genbank 登录号:JQ388891)、饼形碘泡虫(*Myxobolus artus*, Genbank 登录号:FJ710799)等不同物种相比,该序列最低变异位点数分别为 76,89 和 88 个(图 1)。比较 3 个胆囊种群的 18S rDNA 序列,发现其中的变异位点有 0~5 个。而 3 个胆囊种群与肌肉种群相比,该序列变异位点有 8~12 个;与肾脏种群相比,该序列变异位点有 3~8 个。肌肉种群与肾脏种群相比,该序列变异位点有 8 个。

2.3 18S rDNA 序列遗传距离、相似度和 AT 碱基比分析

表 2 显示:3 个胆囊种群与肾脏种群、肌肉种群在 18S rDNA 序列上的遗传距离范围为 0.000~0.009,相似性度范围为 98.8%~100.0%;荆州碘泡虫与阿拉巴哈德碘泡虫、肌肉碘泡虫、饼形碘泡虫等不同物种在 18S rDNA 序列上的遗传距离范围为 0.044~0.074,相似性度范围为 92.4%~95.6%。荆州碘泡虫各种群 18S rDNA 序列的 A, T, C 和 G 的平均碱基比分别为 26.67%, 26.62%, 18.40% 和 28.31%; AT 碱基比为 53.29%, 高于 GC 碱基比(46.71%)。阿拉巴哈德碘泡虫 18S rDNA 序列的 A, T, C 和 G 的碱基比分别为 26.37%, 26.59%, 18.46% 和 28.58%; AT 碱基比为 52.96%, 高于 GC 碱基比(47.04%)。肌肉碘泡虫 18S rDNA 序列的 A, T, C 和 G 的碱基比分别为 26.02%, 27.08%, 18.03% 和 28.87%; AT 碱基比为 53.10%, 高于 GC 碱基比(46.90%)。饼形

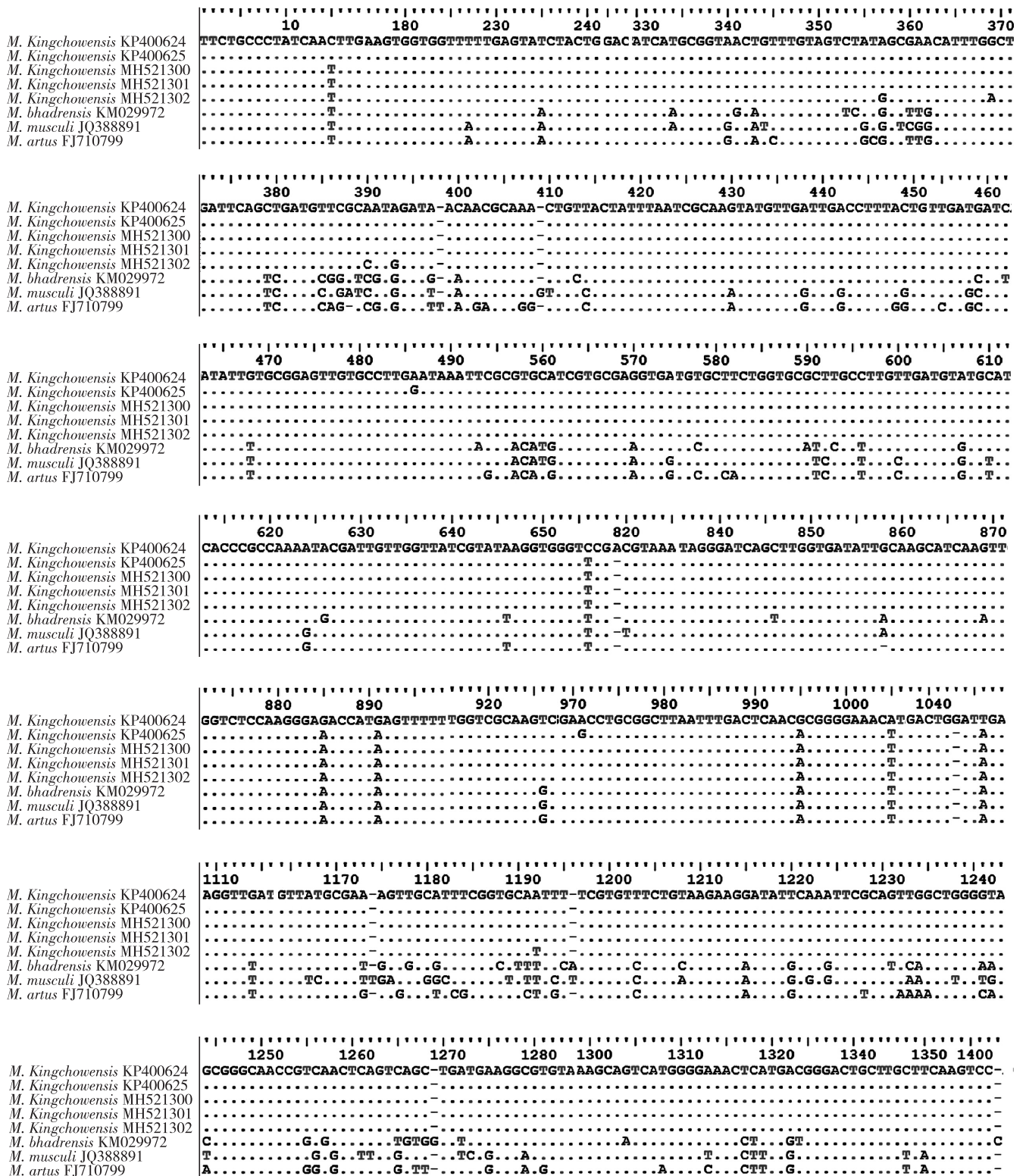
碘泡虫 18S rDNA 序列的 A, T, C 和 G 的碱基比分别为 26.18%, 25.75%, 18.67% 和 29.40%, AT 碱基比为 51.93%, 仍然高于 GC 碱基比(48.07%)。

表 1 荆州碘泡虫胆囊种群与其相似物种的形态特征比较

Tab. 1 The morphometric comparison of gall bladder population of *M. kingchowensis* with the related species μm

物种	宿主	寄生部位	采集地	孢子长	孢子宽	孢子厚	极囊长×极囊宽	资料来源
荆州碘泡虫 (<i>M. kingchowensis</i>)	鲫(<i>C. auratus</i>)、鲢 (<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>)、 鲂(<i>M. terminalis</i>)、 白鲫(<i>Carassius auratus cuvieri</i>)、兴凯鲮 (<i>A. chankaensis</i>)、 金鱼(<i>C. auratus auratus</i>)、 鳊(<i>A. nobilis</i>)	鳃、体 表、肾 脏、肝、 肌肉、 膀胱、 胆囊、 心、鳔、 肠	中国 湖北、 浙江、 广东	10.7	8.3	6.0	7.2(6.2~8.4)×	文献[14]
				(9.6~	(7.2~		3.4(2.6~3.6) ^a	
				12.0)	8.4)		5.9(4.8~6.0)×	
							2.6(2.2~3.0) ^b	
荆州碘泡虫 肌肉种群 (KP400624)	异育银鲫 (<i>C. auratus gibelio</i>)	肌肉	中国 湖北	11.2 (9.8~ 12.1)	8.6 (7.1~ 9.7)	6.6 (5.9~ 7.4)	6.8(5.8~7.7)× 3.4(2.9~4.1) ^a 5.8(4.8~7.0)× 2.7(1.9~3.6) ^b	文献[15]
荆州碘泡虫 肾脏种群 (KP400625)	异育银鲫	肾脏	中国 湖北	10.8 (10.0~ 12.1)	8.3 (6.0~ 9.4)	6.4 (5.5~ 7.1)	6.8(5.2~8.0)× 3.2(2.4~3.7) ^a 5.6(4.6~7.1)× 2.6(2.0~3.4) ^b	文献[15]
荆州碘泡虫 胆囊种群 1 (n=25) (MH521300)	异育银鲫	胆囊	中国 重庆	11.1 (10.5~ 11.7)	9.0 (8.7~ 9.4)	6.9 (6.8~ 7.0)	6.7(6.1~7.3)× 3.3(2.9~3.8) ^a 5.7(5.0~6.3)× 2.7(2.4~3.0) ^b	本研究
荆州碘泡虫 胆囊种群 2 (n=32) (MH521301)	异育银鲫	胆囊	中国 重庆	11.8 (10.8~ 12.8)	8.5 (8.1~ 9.1)		6.4(5.6~6.9)× 3.0(2.1~3.9) ^a 5.4(4.6~5.9)× 2.5(1.9~3.1) ^b	本研究
荆州碘泡虫 胆囊种群 3 (n=30) (MH521302)	异育银鲫	胆囊	中国 重庆	11.0 (10.3~ 11.9)	8.5 (7.7~ 9.0)		6.3(5.8~6.7)× 3.2(2.8~3.5) ^a 5.6(5.2~5.9)× 2.7(2.5~2.8) ^b	本研究
阿拉巴哈德 碘泡虫 (<i>M. bhadrensis</i> , KM029972)	卡特拉鲃 (<i>Catla catla</i>)	肌肉	印度	10.0 (9.2~ 10.4)	6.6 (6.0~ 7.2)	4.5 (4.0~ 5.3)	5.5(4.8~6.0)× 3.0(2.6~3.3) ^a 4.2(3.6~4.8)× 2.0(1.6~2.6) ^b	文献[23]
吴李碘泡虫 (<i>M. wulii</i> , EF690300)	异育银鲫	肝胰腺	中国 湖北	17.7 (16.5~ 18.9)	10.6 (9.1~ 10.8)	8.3 (7.2~ 9.0)	9.3(8.4~9.9)× 3.7(3.4~4.0) ^a 9.0(8.1~9.2)× 3.6(3.4~3.8) ^b	文献[13]

注:物种名后括号内的编号为 Genbank 登录号;表中数据用“平均值(范围)”表示;a, b 分别表示大、小极囊测量数据



注:左侧物种由上到下分别为:荆州碘泡虫的肌肉种群、肾脏种群以及 3 个胆囊种群,阿拉巴哈德碘泡虫,肌肉碘泡虫和饼形碘泡虫

图 1 各物种/种群 18S rDNA 序列变异位点分析

Fig. 1 The regions of variable sites of 18S rDNA among species/populations

2.4 系统发育树分析

选取 25 条相关序列所构建的 BI 树和 ML 树表现出一致的拓扑结构。图 2 显示,该系统发育树共分为两大枝(a 枝和 b 枝),与荆州碘泡虫聚为一枝的碘泡虫,它们的孢子前端平滑且钝圆;其余碘泡虫聚为另一枝,它们的孢子前端统一较尖。在系统树中,鳃寄生的碘泡虫整体上处于系统树的基部(图 2,表 3)。

表 2 基于 18S rDNA 的各物种/种群间的相似度和遗传距离

Tab.2 Similarities and genetic distances among species/populations based on 18S rDNA

编号	物种	Genbank 登录号	编号							
			1	2	3	4	5	6	7	8
1	荆州碘泡虫(<i>M. kingchowensis</i>)肌肉种群	KP400624		99.1%	99.1%	99.1	98.8%	93.4%	92.6%	92.4%
2	荆州碘泡虫肾脏种群	KP400625	0.006		99.8%	99.8%	99.4%	94.0%	93.2%	93.0%
3	荆州碘泡虫胆囊种群 1	MH521300	0.005	0.002		100.0%	99.6%	94.2%	93.4%	93.2%
4	荆州碘泡虫胆囊种群 2	MH521301	0.005	0.002	0.000		99.6%	94.2%	93.4%	93.2%
5	荆州碘泡虫胆囊种群 3	MH521302	0.009	0.006	0.004	0.004		94.5%	93.6%	93.4%
6	阿拉巴哈德碘泡虫(<i>M. bhadrensis</i>)	KM029972	0.062	0.059	0.057	0.057	0.054		94.3%	93.7%
7	肌肉碘泡虫(<i>M. musculi</i>)	JQ388891	0.072	0.068	0.066	0.066	0.064	0.056		95.6%
8	饼形碘泡虫(<i>M. artus</i>)	FJ710799	0.074	0.071	0.068	0.068	0.066	0.059	0.044	

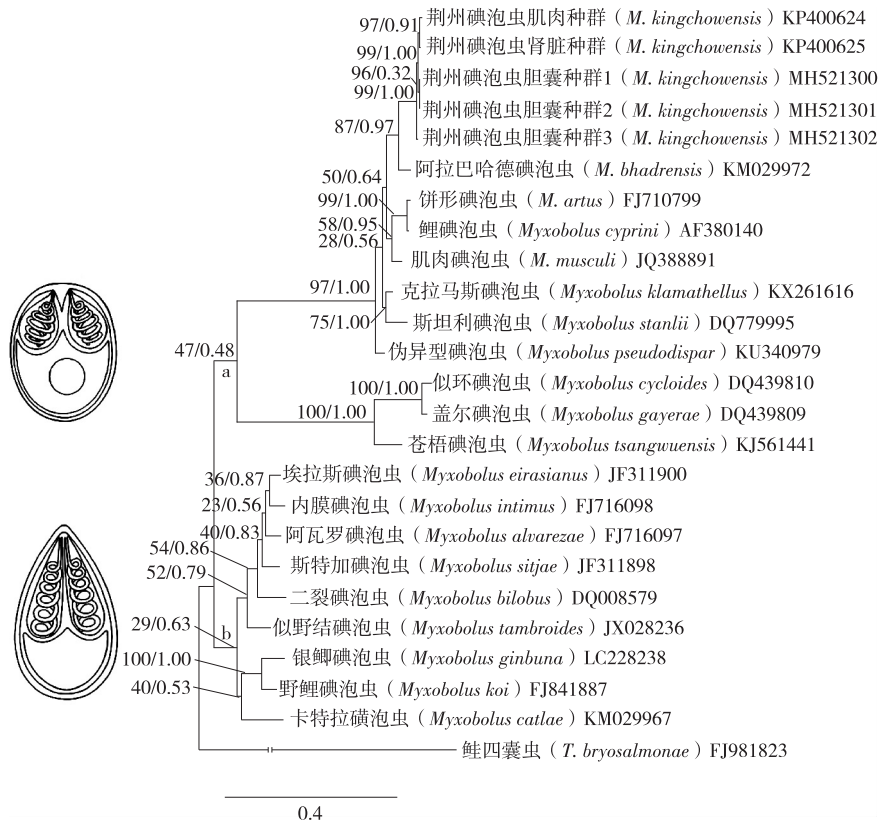
注:左下角数据为遗传距离,右上角为相似度

3 讨论

肌肉碘泡虫的报道多见于在欧洲进行的相关研究。早期将荆州碘泡虫鉴定为肌肉碘泡虫主要是基于寄生部位而言,但后者的宿主以及形态大小均与荆州碘泡虫存在较大差异。本研究通过 18S rDNA 序列比对发现,二者相似性最高只有 93.6% (表 2),这更进一步说明早期鉴定有误,从而证明了荆州碘泡虫重新命名的有效性。

对荆州碘泡虫不同种群及相似物种 18S rDNA 序列变异位点的比较结果显示,荆州碘泡虫不同种群该序列的变异位点数最高为 12 个,而它们与相似物种在该序列上的变异位点数超过了 76 个,此结果符合赵元君等人^[24]认为的同一碘泡虫物种不同种群 18S rDNA 序列变异位点

的一般变化范围(图 1)。同时,对荆州碘泡虫不同寄生部位种群 18S rDNA 序列的变异位点的分析结果还表明,该物种各种群间 18S rDNA 的变异与寄生部位有关(图 1)。有研究报道碘泡虫种内相似度变化范围为 98.6%~100%,遗传距离变化范围为 0.000~0.010^[25-29],这与本研究结果基本一致(表 2)。本研究中,荆州碘泡虫各种群 18S rDNA 序列的 AT 平均碱基比(53.29%)高于 GC 平均碱基比(46.71%),表现出一定的 AT 组成偏向性,而较高的 AT 碱基比有利于 DNA 序列的变异和种群分化。



注:a 枝上碘泡虫的孢子形态前端如左上小图所示,b 枝上碘泡虫的孢子形态前端如左下小图所示;物种名后的编号为 Genbank 登录号

图 2 基于 18S rDNA 序列构建的碘泡虫 ML/BI 系统发育树

Fig.2 The phylogenetic tree of ML/BI of *Myxobolus* based on 18S rDNA

表 3 相关碘泡虫物种信息
Tab. 3 The information of *Myxobolus* species

物种	Genbank 登录号	寄生部位	宿主	采集地
荆州碘泡虫(<i>M. kingchowensis</i>) 肌肉种群	KP400624	肌肉	异育银鲫(<i>C. auratus gibelio</i>)	中国湖北
荆州碘泡虫肾脏种群	KP400625	肾脏	异育银鲫	中国湖北
荆州碘泡虫胆囊种群 1	MH521300	胆囊	异育银鲫	中国重庆
荆州碘泡虫胆囊种群 2	MH521301	胆囊	异育银鲫	中国重庆
荆州碘泡虫胆囊种群 3	MH521302	胆囊	异育银鲫	中国重庆
阿拉巴哈德碘泡虫(<i>M. bhadrensis</i>)	KM029972	肌肉	卡特拉鲃(<i>C. catla</i>)	印度
饼形碘泡虫(<i>M. artus</i>)	FJ710799	骨骼肌	鲤(<i>Cyprinus carpio</i>)	中国湖北
鲤碘泡虫(<i>M. cyprini</i>)	AF380140	肌肉	鲤	匈牙利
肌肉碘泡虫(<i>M. musculi</i>)	JQ388891	肌肉	博氏鲃(<i>Luciobarbus bocagei</i>)	葡萄牙埃斯特河
克拉马斯碘泡虫(<i>M. klamathellus</i>)	KX261616	皮下、肾脏	蓝骨尾鱼(<i>Gila coerulea</i>)	美国克拉马斯湖
斯坦利碘泡虫(<i>M. stanlii</i>)	DQ779995	肌肉的结缔组织	稀鳞曲口鱼(<i>Cam postoma oligolepis</i>)	美国阿拉巴马州
伪异型碘泡虫(<i>M. pseudodispar</i>)	KU340979	肌肉	红眼鱼(<i>Scardinius erythrophthalmus</i>)	匈牙利巴拉顿湖
似环碘泡虫(<i>M. cycloides</i>)	DQ439810	鳔的结缔组织	圆鳍雅罗鱼(<i>Leuciscus cephalus</i>)	匈牙利多瑙河
盖尔碘泡虫(<i>M. gayerae</i>)	DQ439809	肠壁	圆鳍雅罗鱼	匈牙利多瑙河
苍梧碘泡虫(<i>M. tsangwuensis</i>)	KJ561441	鳃	鲤	中国湖北
埃拉斯碘泡虫(<i>M. eirasianus</i>)	JF311900	鳃片的毛细血管网	粗鳞鲃(<i>Blicca bjoerkna</i>)	匈牙利
内膜碘泡虫(<i>M. intimus</i>)	FJ716098	鳃片的毛细血管网	圆腹雅罗鱼	匈牙利
阿瓦罗碘泡虫(<i>M. alvarezae</i>)	FJ716097	鳃的多层上皮	赤梢鱼(<i>Aspius aspius</i>)	匈牙利
斯特加碘泡虫(<i>M. sitjae</i>)	JF311898	鳃的多层上皮	粗鳞鲃(<i>Blicca bjoerkna</i>)	匈牙利
二裂碘泡虫(<i>M. bilobus</i>)	DQ008579	鳃丝远端	金体美鲃(<i>Notemigonus crysoleucas</i>)	加拿大
似野结碘泡虫(<i>M. tambroides</i>)	JX028236	鳃	似野结鱼(<i>Tor tambroides</i>)	马来西亚
银鲫碘泡虫(<i>M. ginbuna</i>)	LC228238	鳃片	兰氏鲫(<i>Carassius langsdorfi</i>)	日本
野鲤碘泡虫(<i>M. koi</i>)	FJ841887	鳃	鲤	美国佐治亚州
卡特拉碘泡虫(<i>M. catlae</i>)	KM029967	鳃片	卷须鲃(<i>Cirrhinus cirrhosus</i>)	印度

赵子明等人^[15]发现,肾脏中的荆州碘泡虫不是因寄生在肌肉中的荆州碘泡虫“老化”后进入排泄系统而来,而是放射孢子感染宿主后经历了不同的免疫压力,因而选择了不同的发育途径。这表明肾脏和肌肉是荆州碘泡虫两个稳定的寄生部位,且两者已成为了不同的种群。笔者仅在异育银鲫的胆囊里发现了荆州碘泡虫,因此可以排除荆州碘泡虫偶然从其他感染部位转移至胆囊的可能性。这一情况表明胆囊也是荆州碘泡虫稳定的寄生部位。通过对 18S rDNA 序列的变异位点、遗传距离、相似度和 AT 碱基比的分析可知:寄生于胆囊、肾脏和肌肉的荆州碘泡虫在遗传上已经出现分化,且各种群间隔离时间较长,已形成不同的种群,但尚未形成不同的物种(图 1,表 2)。

对发育系统树各个碘泡虫物种和种群的寄生部位、宿主、采集地以及孢子形态进行分析,发现系统树依据碘泡虫的孢子形态聚枝,前端平滑且钝圆的孢子形态的物种聚为一枝,前端较尖的孢子聚为了另一枝(图 2)。该树的聚枝情况与碘泡虫的寄生部位以及宿主和采集地无紧密相关性,表明在孢子形态上相似的物种具有更近的亲缘关系,这与 Fiala 等人^[30]的观点一致。在系统发育树中,鳃寄生的碘泡虫整体处于树的基部,表明较之于肌肉、肾脏、胆囊、骨骼肌、鳔和肠寄生的碘泡虫,鳃寄生碘泡虫分化较早。这可能与体表寄生和体内寄生的演化有关:与宿主其他寄生部位相比,鳃寄生所需克服的保护屏障较少;而在宿主内部寄生不仅要克服更多的保护屏障,还可能受到宿主免疫反应等的排斥作用。因此,鳃寄生的碘泡虫可能是较早定居的类群,随着该类群的不断进化和侵入宿主能力的加强,由此逐渐分化出在鱼体内部寄居的其他碘泡虫类群。

参考文献:

- [1] KENT M L, ANDREE K B, BARTHOLOMEW J L, et al. Recent advances in our knowledge of the Myxozoa[J]. Journal of Eukaryotic Microbiology, 2010, 48(4): 395-413.
- [2] LODH N, KERANS B L, STEVENS L. The parasite that causes whirling disease, *Myxobolus cerebralis*, is genetically variable within and across spatial scales[J]. Journal of Eukaryotic Microbiology, 2012, 59(1): 80-87.
- [3] MOLNÁR K, SZÉKELY C. Myxobolus infection of the gills of common bream (*Abramis brama* L.) in Lake Balaton and in the Kis-Balaton reservoir, Hungary[J]. Acta Veterinaria Hungarica, 1999, 47(4): 419-432.
- [4] ABDEL-GHAFFAR F, ABDEL-BAKI A A, GARHY M E. Ultrastructural characteristics of the sporogenesis of genus, *Myxobolus*, infecting some Nile fishes in Egypt[J]. Parasitology Research, 2005, 95(3): 167-171.
- [5] ZHAO Y J, AL-FARRAJ S A, AL-RASHEID K A S, et al. Data on ten new myxosporean parasites (Myxozoa, Myxosporae, Bivalvulida) from the Yellow sea, China[J]. Acta Protozoologica, 2015, 54(4): 305-323.
- [6] ALI M, ABDEL-BAKI A A, SAKRAN T. *Myxidium elmatboulii* n. sp and *Ceratomyxa ghaffari* n. sp (Myxozoa: Myxosporae) parasitic in the gallbladder of the red sea houndrsh *Tylosurus choram* (Ruppell, 1837) (Teleostei: Belonidae) from the Red sea, Egypt[J]. Acta Protozoologica, 2006, 45(1): 97-103.
- [7] 宋微波, 赵元君, 徐奎栋, 等. 海水养殖中的危害性原生动物[M]. 北京: 科学出版社, 2003: 315-428.
- SONG W B, ZHAO Y J, XU K D, et al. Pathogenic protozoa in mariculture[M]. Beijing: Science Press, 2003: 315-428.
- [8] CANNING E U, OKAMURA B. Biodiversity and evolution of the myxozoa[J]. Advances in Parasitology, 2004, 56(2): 44-131.
- [9] 索栋, 赵元君. 尼氏单极虫(粘体门, 双壳目)重描述及基于 18S rDNA 系统地位分析[J]. 动物分类学报, 2010, 35(1): 90-95.
- SUO D, ZHAO Y J. Morphological redescription of *T. nikolskii* Achmerov, 1955 (Myxozoa, Bivalvulida) and phylogenetic analysis of *Thelohanellus nikolskii* inferred from 18S rDNA[J]. Acta Zootaxonomica Sinica, 2010, 35(1): 90-95.
- [10] OKAMURA B, GRUHL A, BARTHOLOMEW J L. An introduction to myxozoan evolution, ecology and development[M]//OKAMURA B, GRUHL A, BARTHOLOMEW J L. Myxozoan evolution, ecology and development. [S. l.]: Springer International Publishing, 2015: 1-20.
- [11] EIRAS J C, MOLNÁR K, LU Y S. Synopsis of the species of *Myxobolus* Bütschli, 1882 (Myxozoa: Myxosporae: Myxobolidae)[J]. Systematic Parasitology, 2005, 61(1): 1-46.
- [12] LOM J, DYKOVÁ I. Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species[J]. Folia Parasitologica, 2006, 53(1): 1-36.
- [13] ZHANG J Y, YOKOYAMA H, WANG J G, et al. Utilization of tissue habitats by *Myxobolus wulii*, Landsberg & Lom, 1991 in different carp hosts and disease resistance in allogynogenetic gibel carp: redescription of *M. wulii*, from China and Japan[J]. Journal of Fish Diseases, 2010, 33(1): 57-68.
- [14] 陈启鏊, 马成伦. 中国动物志, 粘体门[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 412-524.
- CHEN Q L, MA C L. China Fauna: Myxozoa, Bivalvulida (Freshwater) [M]. Beijing: Science Press, 1998: 412-524.
- [15] 赵子明, 刘新华, 赵媛莉, 等. 荆州碘泡虫(粘体动物门, 碘泡虫科)重描述及其基于 18srDNA 系统发育关系分析[J]. 淡水渔业, 2017, 47(2): 79-85.
- ZHAO Z M, LIU X H, ZHAO Y L, et al. Redescription and phylogenetic analysis based on 18S rDNA of *Myxobolus kingchowensis* (Myxozoa, Myxobolidae)[J]. Freshwater Fisheries, 2017, 47(2): 79-85.
- [16] 赵元君, 马成伦, 宋微波. 海水养殖中原生动物病原虫的鉴定—II 粘孢子虫的研究及鉴定方法[J]. 青岛海洋大学学报(自然科学版), 2001, 31(5): 681-688.
- ZHAO Y J, MA C L, SONG W B. Illustrated guide to the identification of pathogenetic protozoa in mariculture-II diagnostic methods for the myxosporean[J]. Journal of Ocean University of Qingdao (Natural Science), 2001, 31: 681-688.
- [17] HILLIS D M, DIXON M T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference[J]. Quarterly Review of Biology, 1991, 66(4): 411-453.
- [18] WHIPPS C M, ADLARD R D, BRYANT M S, et al. First report of three *Kudoa* species from Eastern Australia: *Kudoa thyrsites* from mahi mahi (*Coryphaena hippurus*), *Kudoa amamiensis* and *Kudoa minithyrsites* n. sp. from sweeper (*Pempheris ypsilychnus*) [J]. Journal of Eukaryotic Microbiology, 2003, 50(3): 215-219.
- [19] 高永杰, 杨承忠, 赵元君. 多涅茨尾孢虫 ITS-5. 8S rDNA 的种群地理学研究[J]. 重庆师范大学学报(自然科学版), 2015, 32(3): 48-53.
- GAO Y J, YANG C Z, ZHAO Y J. Population geography of *Henneguya doneci* base on ITS-5. 8S rDNA[J]. Journal of Chongqing Normal University (Natural Science), 2015, 32(3): 48-53.
- [20] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30(12):

2725-2729.

- [21] RONQUIST F, HUELSENBECK J P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models[J]. *Bioinformatics*, 2003, 19(12): 1572-1574.
- [22] 李楠楠, 赵元君, 唐发辉, 等. 基于 18S rDNA 序列对单尾虫属(粘体门, 双壳目)的系统学研究[J]. *内江师范学院学报*, 2012, 27(12): 38-42.
- LI N N, ZHAO Y J, TANG F H, et al. Phylogenetic study on *Unicauda* genus (Myxozoa, Bivalvulida) based on 18S rDNA sequences[J]. *Neijiang Normal University*, 2012, 27(12): 38-42.
- [23] SZÉKELY C, CECH G, CHAUDHARY A, et al. Myxozoan infections of the three Indian major carps in fish ponds around Meerut, UP, India, with descriptions of three new species, *Myxobolus basuhaldari* sp. n., *M. kalavatieae* sp. n. and *M. meerutensis* sp. n., and the redescription of *M. catlae* and *M. bhadrensis*[J]. *Parasitology Research*, 2015, 114(4): 1301-1311.
- [24] ZHAO Y J, LI N N, TANG F H, et al. Remarks on the validity of *Myxobolus ampullicapsulatus* and *Myxobolus honghuensis* (Myxozoa: Myxosporidia) based on SSU rDNA sequences[J]. *Parasitology Research*, 2013, 112(11): 3817-3823.
- [25] MOLNÁR K, ESZTERBAUER E, MARTON S, et al. Comparison of the *Myxobolus* fauna of common barbel from Hungary and Iberian barbel from Portugal[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2015, 100(3): 231-248.
- [26] KARLSBAKK E, KRISTMUNDSSON Á, ALBANO M, et al. Redescription and phylogenetic position of *Myxobolus aeglefini* and *Myxobolus platessae* n. Comb. (Myxosporidia), parasites in the cartilage of some North Atlantic marine fishes, with notes on the phylogeny and classification of the Platysporina[J]. *Parasitology International*, 2017, 66(1): 952-959.
- [27] URAWA S, FREEMAN M A, JOHNSON S C, et al. Geographical variation in spore morphology, gene sequences, and host specificity of *Myxobolus arcticus* (Myxozoa) infecting salmonid nerve tissues[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2011, 96(3): 229-237.
- [28] YOKOYAMA H, YANAGIDA T, FREEMAN M A, et al. Molecular diagnosis of *Myxobolus spirosulcatus* associated with encephalomyelitis of cultured yellowtail, *Seriola quinqueradiata* Temminck & Schlegel[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2010, 33(12): 939-946.
- [29] 冉佼, 杨承忠, 赵元君. 基于遗传距离的粘孢子虫分类研究[J]. *重庆师范大学学报(自然科学版)*, 2014, 31(3): 31-34.
- RAN J, YANG C Z, ZHAO Y J. Taxonomic research of the Myxosporidia based on genetic distance[J]. *Journal of Chongqing Normal University (Natural Science)*, 2014, 31(3): 31-34.
- [30] FIALA I, BARTOŠOVÁ P. History of myxozoan character evolution on the basis of rDNA and EF-2 data[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2010, 10(1): 228.

Animal Sciences

Population Divergence of *Myxobolus kingchowensis* on Different Parasite-Sites

WANG Mao, ZHAO Yuanjun, GAO Lei, YANG Chengzhong

(Chongqing Key Laboratory of Animal Biology, College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract: [Purposes] It aims to investigate the population divergence of *Myxobolus kingchowensis* on different parasite-sites and phylogenetic relationship. [Methods] Comparisons were conducted on *M. kingchowensis* with the related congeners via their morphological characteristics, sequence similarity, genetic distance, variable sites, AT ratio and phylogeny based on 18S rDNA. [Findings] Basically, the populations of *M. kingchowensis* from Chongqing and Wuhan shared a consistent morphological characteristics; these populations had 98.8% ~ 100.0% similarity, 0.000 ~ 0.009 genetic distance, and 3 ~ 12 variation sites and higher AT ratio (53.29%) than GC ratio (46.71%); the phylogenetic tree revealed that *Myxobolus* species were grouped into two main groups: species with smooth and blunt round spore morphology clustered together as a clade, which is sister to another clade formed by the species with sharp spores; the gill-infecting species of *Myxobolus* are generally at the base of the phylogenetic tree. [Conclusions] Populations of *M. kingchowensis* infecting different sites of *Carassius auratus gibelio* were genetically divergent; species with similar spores shape were closely related; the gill-infecting species of *Myxobolus* diverged earlier than those infecting muscle, kidney, gall bladder, skeletal muscle, swim bladder and intestine.

Keywords: *Myxobolus kingchowensis*; 18S rDNA; population divergence; parasite-sites

(责任编辑 方 兴)

急性光周期紊乱对斑马鱼繁殖行为的影响*

陈鑫, 盛尚, 江涛, 刘智皓

(重庆师范大学 生命科学学院 重庆市高校动物生物学重点实验室 重庆市高校生物活性物质工程研究中心, 重庆 401331)

摘要:【目的】考察急性光周期紊乱对斑马鱼(*Danio rerio*)成鱼繁殖行为的影响。【方法】设置1个正常光周期组(对照组, 12 h光照:12 h黑暗),1个短光周期组(6 h光照:18 h黑暗)和1个长光周期组(18 h光照:6 h黑暗),分别连续暴露雌、雄斑马鱼成鱼3 d,暴露结束后统计斑马鱼的繁殖行为参数,并分析光周期紊乱对斑马鱼繁殖行为的影响及该影响的性别差异。【结果】与对照组的情况相比:1)光周期紊乱严重干扰了斑马鱼雌雄成鱼共同进入产卵区的时间和频次,其中短光周期的影响更为严重;2)光周期紊乱明显干扰了雌雄斑马鱼分别进入产卵区域的时间,而对它们分别进入产卵区域的频次没有明显影响;3)光周期紊乱对斑马鱼繁殖行为的影响没有性别差异。【结论】光周期紊乱明显抑制斑马鱼的繁殖行为,短光周期的抑制作用更为严重,但这种影响没有性别差异。

关键词:光周期紊乱;斑马鱼;繁殖行为;性别差异

中图分类号:Q492.5

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2019)01-0037-05

动物的昼夜节律由内在的生物计时系统支撑,是一系列行为、生理和分子参数的周期性(24 h左右)变化^[1]。环境光是促使动物体内部昼夜节律系统与外部同步的关键因素,与动物的生命活动密切相关^[1]。地球上的各种生物在长期的进化过程中已对稳定的光周期变化形成了适应。昼夜节律(正常的光周期)对人类及其他各种动物正常生理功能的维持不可或缺。有研究发现,正常的光周期在鱼类的生长发育、摄食和繁殖等生理活动中起重要作用^[2-5]。光周期变化会影响鱼类的生长、性腺发育、产卵量、肝脏能量储备、幼鱼的生长发育等^[6-11]。光周期的紊乱还能干扰鱼类的视觉行为、学习能力和觉醒阈值^[12-14]。异常照明能改变动物视觉行为的发育^[13],睡眠剥夺能明显损害斑马鱼(*Danio rerio*)对电击的行为反应及回避能力^[14]。

斑马鱼是一种原产于印度和孟加拉的小型淡水鱼类,是动物生殖、发育、行为等方向研究的重要模型。斑马鱼的繁殖需要在清晨予以光照刺激,光照时间的早晚直接影响到该物种是否产卵及产卵量大小^[6],因此该物种繁殖行为受到光照及光周期的调节,而紊乱的光周期很可能会改变斑马鱼的繁殖行为。为此,本研究将斑马鱼雌雄成鱼放入不同光周期环境中连续饲养3 d后,在清晨光照刺激后录制繁殖视频并分析斑马鱼在繁殖过程中的各种繁殖行为的变化,初步探讨急性光周期变化对斑马鱼繁殖行为的影响及该影响的性别差异,从而为有关光周期在鱼类繁殖和繁殖行为调控中的作用及相关调控机理的研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料与处理

实验用斑马鱼雌雄成鱼(AB系,120天龄)购自武汉国家斑马鱼资源中心,雌鱼和雄鱼的平均体质量分别为(0.45±0.05),(0.32±0.08)g。在光周期暴露实验前,将雌鱼和雄鱼置于暗室中分别驯养14 d。驯养时的光照条件为正常光周期即12 h光照:12 h黑暗,其中每日9:00—21:00为光照时期,光源为照度1 000 lx的日光灯;驯养水温为(28±0.5)℃;驯养期间每日喂食2次,换水1次。驯养结束后,设置1个对照组,采用驯养期的光照条件;1个短光周期组,光照条件为6 h光照:18 h黑暗,每日12:00—18:00为光照时期;1个长光周期组,光照

* 收稿日期:2018-05-15 修回日期:2018-07-09 网络出版时间:2019-01-09 7:31

资助项目:重庆市基础科学与前沿技术研究专项基金(No. cstc2016jcyjA1032);重庆市教育委员会科学技术研究项目(No. KJ130622; No. KJ1600308);重庆师范大学校级基金项目(No. 13XLZ08)

第一作者简介:陈鑫,女,研究方向为水生生态学,E-mail:chenxjy@163.com;通信作者:刘智皓,男,副教授,博士,E-mail:minenut@163.com

网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20190109.0731.004.html

条件为 18 h 光照 : 6 h 黑暗, 每日 6:00—0:00 为光照时期。对雌鱼和雄鱼分别进行暴露。每日喂食 2 次, 喂食时间为 12:30 和 17:30; 换水 1 次, 换水时间为 15:00。喂食和换水时间均处于光照时期内, 以保证黑暗环境不被人活动所破坏。暴露期间保持氧气、光照充足, 连续暴露 3 d。在实验鱼进行繁殖行为的前 1 天 17:00, 将 1 尾雌鱼和 1 尾雄鱼放入用可流通水挡板隔离的 30 L 容积的玻璃鱼缸内, 加水 25 L。每组设置 9 个平行缸。在暴露结束后的第 2 天 7:00 前, 于鱼缸正上方安装日本索尼公司生产的 SONY DSC-RX100 M4 摄像机, 撤去挡板, 将装有 5 mm 玻璃珠的塑料盒(7 cm×7 cm×2.5 cm)放置于鱼缸角落, 作为产卵区域。光照 5 min 用以刺激实验鱼繁殖, 然后摄像以记录实验鱼的繁殖行为, 记录时长 30 min。水质参数如硝酸盐、亚硝酸盐、溶解氧等物质含量以及 pH 都控制在正常范围内。每 3 个平行缸使用 1 台摄像机对行为进行拍摄, 每组使用 3 台摄像机。所有雌鱼和雄鱼繁殖行为的记录共使用 9 台摄像机同时拍摄。

斑马鱼繁殖行为的统计方法参照 Baatrup 和 Henriksen^[15]的方法进行。雌、雄斑马鱼繁殖行为的统计指标为: 1) 雌、雄斑马鱼相遇频次(雄鱼和雌鱼之间的距离小于 0.5 cm 即为相遇); 2) 相互追逐频次; 3) 雌、雄斑马鱼同时进入产卵区域的频次与逗留时间; 4) 雌、雄斑马鱼单独进入产卵区的频次与逗留时间。斑马鱼分别进入产卵区域频次的性别差异通过比较“(对照组雌鱼进入频次—短(长)光周期处理组雌鱼进入频次)/对照组雌鱼进入频次”的计算值与“(对照组雄鱼进入频次—短(长)光周期处理组雄鱼进入频次)/对照组雄鱼进入频次”的计算值来加以分析。斑马鱼分别进入产卵区域时间的性别差异通过比较“(对照组雌鱼进入时间—短(长)光周期处理组雌鱼进入时间)/对照组雌鱼进入时间”的计算值与“(对照组雄鱼进入时间—短(长)光周期处理组雄鱼进入时间)/对照组雄鱼进入时间”的计算值来进行分析。

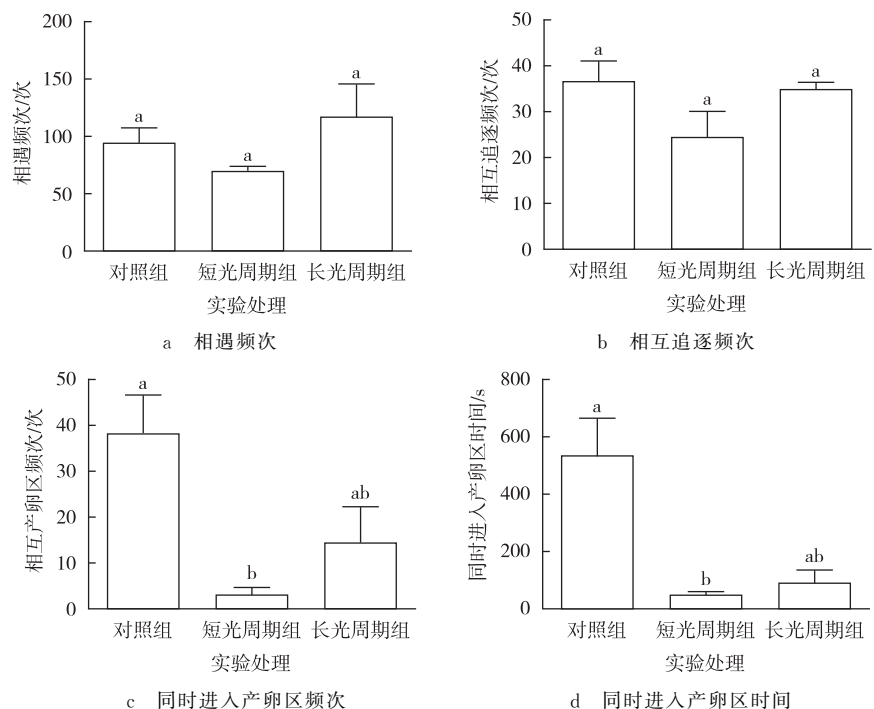
1.2 数据统计

实验数据均以“平均值±标准误”表示, 采用 Excel 2003 和 SPSS 13.0 软件对数据进行常规计算及统计处理。各项指标的统计均使用 *t* 检验进行分析。当 $p < 0.05$ 时, 上述统计结果具有统计学意义。柱形图使用 GraphPad Prism 6 软件(San Diego, CA)绘制。

2 结果

2.1 对雌鱼和雄鱼相遇、相互追逐频次以及同时进入产卵区的频次和时间的的影响

图 1a, b 显示, 3 个处理组的雌、雄斑马鱼相遇频次和相互追逐频次均无统计学意义上的差异。与对照组的情况相比, 短光周期组雌、雄斑马鱼同时进入产卵区的频次有统计学意义上的下降($p < 0.05$); 而长光周期组雌、雄斑马鱼同时进入产卵区的频次也有减少的趋势, 但与对照组这一指标的差异不具有统计学意义(图 1c)。短、长光周期组与对照组相比, 前两者的雌、雄斑马鱼同时进入产卵区的时间均有统计学意义上的减少($p < 0.05$), 但前两者的这一指标无具有统计学意义上的差异(图 1d)。



注: 不同字母表示组间数据差异具有统计学意义($p < 0.05$), 下同

图 1 光周期紊乱对雌雄斑马鱼相遇、相互追逐频次以及同时进入产卵区的频次、时间的影响

Fig. 1 Effects of photoperiod disturbances on the frequencies of both male and female zebrafish meeting or chasing each other and the frequencies and the durations of both of them staying in spawning area simultaneously

2.2 对雌鱼和雄鱼单独进入产卵区的频次和时间的的影响

与对照组雌、雄斑马鱼进入产卵区域频次相比,短、长光周期组的这一指标均有下降趋势,但有关差异在 3 个处理组间不具有统计学意义(图 2a)。然而,与对照组雌、雄斑马鱼进入产卵区域时间相比,短、长光周期组的这一指标均有统计学意义上的减少($p < 0.05$),但后两者的差异不具有统计学意义(图 2b)。

2.3 光周期紊乱对斑马鱼繁殖行为影响的性别差异

短、长光周期组中,雌鱼进入产卵区域频次均比雄鱼的这一指标更低,但两者差异不具有统计学意义(图 3a)。相反地,短、长光周期组中,雌鱼进入产卵区域时间相对于雄鱼而言更长,但两者差异也不具有统计学意义(图 3b)。

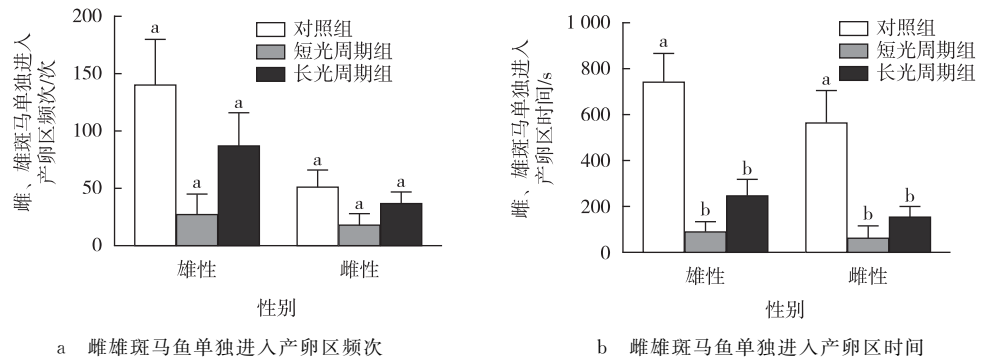


图 2 光周期紊乱对雌雄斑马鱼单独进入产卵区的频次和时间的的影响

Fig. 2 Effects of photoperiod disturbances on the frequencies and the durations of male or female zebrafish staying in spawning area alone

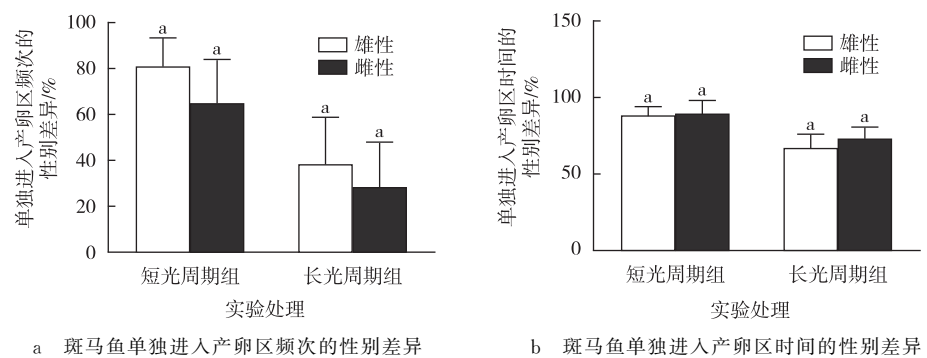


图 3 光周期紊乱对斑马鱼单独进入产卵区的频次和时间影响的性别差异

Fig. 3 The sexual differences of effects of photoperiod disturbances on the frequencies and the durations of different sexual zebrafish staying in spawning area alone

3 讨论与结论

研究表明,不同光周期对小鼠(*Mus musculus*)的血浆皮质激素和生长激素水平产生不同的影响,能干扰小鼠的生长速度^[16]。相似的研究发现,较短的光照时间能降低大绒鼠(*Eothenomys miletus*)的体质量^[17]。对禽类的研究发现,较长的光周期能明显上调产前 ISA 褐蛋鸡(*Gallus gallus*)下丘脑中 *GnRH-I* mRNA 表达,促进卵巢的发育^[18];相反地,较短的光周期则明显下调该品种鸡的垂体 *GnRH-Ra* mRNA 表达,致使卵巢发育延缓^[18]。由此可见,正常的光周期在动物的繁殖调节和性腺的周期性发育过程中起重要作用。另有研究表明,夜间人为给予光照会影响 C57Bl/6 小鼠的情感行为,如抑郁行为和焦虑行为^[1]。不同光周期处理对蛋用型北京油鸡的就巢和产蛋行为也有明显影响^[19]。上述研究表明,紊乱的光周期还可能通过影响动物的行为(尤其是繁殖行为)来干扰动物的繁殖性能。

有关黄金鲈鱼(*Perca flavescens*)、奥尼鱼(*Oreochromis niloticus* ♀ × *Oreochromis aureus* ♂)的研究表明,适当延长光照时间可以促进这两种鱼的生长^[8-9],对松江鲈鱼(*Trachidermus fasciatus*)的性腺发育及肝脏能量储备也有明显影响^[10]。相反,缩短光周期能促进鲑鳟鱼类的性腺发育^[11]。此外,环境照明对斑马鱼胚胎发育和随后幼鱼的生长和发育有重要影响^[6];夜间给予红光能降低斑马鱼的产卵量^[7]。光周期紊乱还能干扰鱼类视觉行为的发育、学习能力、觉醒阈值等。相关研究表明,夜晚光照会导致斑马鱼幼鱼和成鱼表现出更高的觉醒阈值并增加白天休息时间^[12]。恒定光照时间延长还能改变斑马鱼视觉行为的发育^[13];而剥夺睡眠能显著损害斑马鱼对电击的行为反应及回避学习能力^[14]。然而,光周期紊乱是否会干扰鱼类的繁殖行为,这种干扰效应是否具有性别差异,尚无任何报道。

在本研究中,持续 3 d 的急性光周期紊乱对斑马鱼的部分繁殖行为如相遇次数、相互追逐次数等并无明显影响,表明光周期紊乱可能对斑马鱼的求偶行为影响有限。另一个解释是,研究中设置的光周期紊乱持续时间尚

不足以影响斑马鱼的求偶过程。斑马鱼的繁殖有 2 个特性:1) 需要将卵产入石堆中;2) 若无石堆将吞食自己(或配偶)产出的鱼卵。本研究在鱼缸中放入一个装有玻璃球的塑料盒,以模拟产卵区域(石堆)。结果表明,短光周期组中,雌、雄斑马鱼共同进入产卵区的频次明显下降,而长光周期组中雌、雄斑马鱼进入产卵区域频次和对照组中的情况相比则无明显变化,似乎说明长光周期对斑马鱼的繁殖行为没有明显影响。然而,无论是短光周期组还是长光周期组,其中的雌、雄斑马鱼共同进入产卵区域时间同对照组的情况相比均明显减少,表明雌、雄斑马鱼的产卵或排精意愿可能均明显降低。因此可以推测:急性光周期紊乱能明显干扰斑马鱼的繁殖行为,且短光周期的这一影响可能更加剧烈。本研究还发现,经过短光周期和长光周期暴露后,与对照组的情况相比,尽管雌、雄斑马鱼单独进入产卵区域频次没有明显变化,但它们单独进入产卵区域时间均明显降低。上述结果表明,经过短、长光周期暴露后的斑马鱼虽然仍然频繁进入产卵区域,但逗留在繁殖区域产卵、排精的意愿均明显降低。

由于鱼类雌雄两性在繁殖地位、身体结构和体内激素环境上存在差异,因此外源胁迫对鱼类雌雄两性的影响通常具有一定的性别差异^[20-21]。然而本研究发现,无论在短光周期组还是长光周期组,雌、雄斑马鱼单独进入产卵区的频次和时间均无明显差异。因此,虽然光周期紊乱能干扰斑马鱼的繁殖行为,但对斑马鱼雌、雄两性的影响可能没有性别差异。此外需要注意的是,在斑马鱼的繁殖过程中,雄性斑马鱼通常会引诱雌性斑马鱼进入产卵区域,因此前者在繁殖过程中常占据主导地位^[22]。那么,雌性斑马鱼繁殖行为的改变及改变程度是直接受光周期紊乱影响还是受限于光周期紊乱导致的雄性斑马鱼繁殖行为改变,还有待进一步深入研究。

综上所述,急性光周期紊乱对斑马鱼繁殖行为有明显影响,其中短光周期的抑制作用更为明显。但光周期紊乱导致的繁殖行为变化无性别差异。本研究为进一步阐明光周期在鱼类繁殖和繁殖行为调控中的作用奠定了基础。

参考文献:

- [1] CLEARY-GAFFNEY M, COOGAN A N. Limited evidence for affective and diurnal rhythm responses to dim light-at-night in male and female C57Bl/6 mice[J]. *Physiology & Behavior*, 2018, 189(15): 78-85.
- [2] FALAHATKAR B, POURSAEID S, EFATPANAH I, et al. Effect of photoperiod manipulation on growth performance, physiological and hematological indices in juvenile persian sturgeon, *Acipenser persicus* [J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2012, 43(5): 679-687.
- [3] KEZUKA H, KOBAYASHI M, AIDA K, et al. Effects of photoperiod and pinealectomy on the gonadotropin surge and ovulation in goldfish *Carassius auratus* [J]. *Nsugaf*, 1989, 55(12): 2099-2103.
- [4] NISEMBAUM L G, VELARDE E, TINOCO A B, et al. Light-dark cycle and feeding time differentially entrains the gut molecular clock of the goldfish (*Carassius auratus*) [J]. *Chronobiology International*, 2012, 29(6): 665-73.
- [5] GHOMI M R, ZAREI M, SOHRABNEJAD M. Effect of photoperiod on growth and feed conversion of juvenile wild carp, *Cyprinus carpio* [J]. *Acta Biologica Hungarica*, 2011, 62(2): 215-218.
- [6] VILLAMIZAR N, VERA L M, FOULKES N S, et al. Effect of lighting conditions on zebrafish growth and development [J]. *Zebrafish*, 2014, 11(2): 173-181.
- [7] ADATTO I, KRUG L, ZON L I. The red light district and its effects on zebrafish reproduction [J]. *Zebrafish*, 2016, 13(3): 226-229.
- [8] 陈文银. 光周期对黄金鲈鱼生长的影响 [J]. *上海水产大学学报*, 2006, 15(3): 303-307.
CHEN W Y. Effects of photoperiod on the growth of yellow perch *perca flavescens* [J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2006, 15(3): 303-307.
- [9] 卞祖良, 詹杰, 陈敏. 在受控条件下养殖密度和光周期对奥尼鱼生长的影响 [C] // 中国空间科学学会空间生命专业委员会. 中国空间科学学会第 16 届空间生命学术研讨会论文集摘要集. 北京: 中国空间科学学会空间生命专业委员会, 2005.
BIAN Z L, ZHAN J, CHEN M. Effects of culture density and photoperiod on the growth of *Oreochromis niloticus* ♀ × *Oreochromis aureus* ♂ under controlled conditions [C] // Committee of Space Life Specialty of Chinese Society of Space Research. Abstracts of the sixteenth space life symposium of the Chinese Society of Space Research. Beijing: Committee of Space Life Specialty of Chinese Society of Space Research, 2005.
- [10] 祝斐, 张志勇, 徐献明, 等. 光周期对松江鲈鱼生长和性腺发育影响的初步研究 [J]. *海洋科学*, 2016, 40(9): 32-38.
ZHU F, ZHANG Z Y, XU X M, et al. Preliminary study on growth and gonadal development of reared under different photoperiods [J]. *Marine Sciences*, 2016, 40(9): 32-38.
- [11] VLAMING V L D. Environmental control of teleost re-

- productive cycle: a brief review[J]. *Journal of Fish Biology*, 2010, 4(1):131-140.
- [12] ZHDANOVA I V. Sleep in zebrafish[J]. *Zebrafish*, 2006, 3(2):215-226.
- [13] BILOTTA J. Effects of abnormal lighting on the development of zebrafish visual behavior[J]. *Behavioural Brain Research*, 2000, 116(1):81-87.
- [14] PINHEIRO-DA-SILVA J, TRAN S, LUCHIARI A C. Sleep deprivation impairs cognitive performance in zebrafish; a matter of fact? [J]. *Behavioural Processes*, 2018, 157:656-663.
- [15] BAATRUP E, HENRIKSEN P G. Disrupted reproductive behavior in unexposed female zebrafish (*Danio rerio*) paired with males exposed to low concentrations of 17 α -ethinylestradiol (EE2)[J]. *Aquatic Toxicology*, 2015, 160:197-204.
- [16] 江舟. 不同周期光暗循环对小鼠生长和摄食的影响[D]. 成都: 四川大学, 2005.
JIANG Z. Effects of different cycles of light dark circulation on growth and ingestion of mice[D]. Chengdu: Sichuan University, 2005.
- [17] 张海姬, 梅丽, 侯东敏, 等. 不同光周期对大绒鼠身体组成和消化道形态的影响[J]. *绿色科技*, 2017(14):157-159.
ZHANG H J, MEI L, HOU D M, et al. Effects of different photoperiod on body composition and morphology of alimentary canal in *Eothenomys miletus*[J]. *Journal of Green Science and Technology*, 2017(14):157-159.
- [18] 吕锦芳, 饶开晴, 姜锦鹏, 等. 光周期对蛋鸡 *GnRH-I*, *GnRH-Ra* mRNA 表达和卵巢发育的影响[J]. *激光生物学报*, 2015, 24(3):251-256.
LÜ J F, RAO K Q, JIANG J P, et al. Effects of photoperiods on *GnRH-I*, *GnRH-Ra* mRNA expression and ovary development in layers[J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 2015, 24(3):251-256.
- [19] 耿爱莲, 石晓琳, 张尧. 光周期对蛋用型北京油鸡就巢产蛋行为发生的影响[J]. *中国家禽*, 2013, 35(20):23-27.
GENG A L, SHI X L, ZHANG Y. Effect of photoperiod on incidence of broody an egg-laying behavior of egg-type Beijing You chicken[J]. *China Poultry China Poultry*, 2013, 35(20):23-27.
- [20] 谢晴. 镉胁迫下黑点青鳉金属硫蛋白基因性别差异性表达及其应用研究[D]. 厦门: 自然资源部第三海洋研究所, 2016.
XIE Q. Study on gender difference of hepatic metallothionein mRNA expression of *Oryzias melastigma* exposed to cadmium[D]. Xiameng: Third Institute of Oceanography, Ministry of Natural Resources, 2016.
- [21] LIANG X, FESWICK A, SIMMONS D, et al. Reprint of: environmental toxicology and omics: a question of sex[J]. *Journal of Proteomics*, 2018, 170:152-164.
- [22] Westerfield M. *The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish *Danio (Brachydanio) rerio**[M]. 4th ed. Eugene, Oregon: University of Oregon Press, 2000.

Animal Sciences

Effects of Acute Photoperiod Disturbances on the Reproductive Behaviors of Zebrafish

CHEN Xin, SHENG Shang, JIANG Tao, LIU Zhihao

(Chongqing Engineering Research Center of Bioactive Substances, Chongqing Key Laboratory of Animal Biology, College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract: [Purposes] To investigate effects of acute photoperiod disturbances on the reproductive behavior of zebrafish. [Methods] Both males and females of adult zebrafish (*Danio rerio*) were exposed to the normal (12 h light; 12 h dark) (Control), short sunlight (6 h light; 18 h dark) and long sunlight (18 h light; 6 h dark) photoperiod for 3 days. After exposure, the reproductive behaviors were measured and the sexual differences were further analyzed. [Findings] Compared to the control: 1) The photoperiod disturbances severely interfered with the frequencies/durations for both sexes in spawning area simultaneously, with more severe impact in the Low-light group; 2) The photoperiod disturbances significantly interfered with the duration in spawning area of male and female, respectively, while the frequencies in spawning area of male and female remained unchanged, respectively; 3) No difference in altered reproductive behaviors in each treated group was identified between sexes. [Conclusions] Photoperiod disturbances significantly disrupted the reproductive behaviors of adult zebrafish, with more severe impact on the Low-light group, however, no sexual difference was identified between sexes.

Keywords: photoperiod disturbances; zebrafish; reproductive behavior; sexual difference

(责任编辑 方 兴)

水体双酚 A 暴露对鲤肝肾的氧化胁迫及静止代谢率的影响*

张江惠, 吴光洁, 唐婉琴, 袁伦强

(西南大学 淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室, 重庆 400715)

摘要:【目的】研究水体中双酚 A(BPA)暴露对鲤(*Cyprinus carpio*)肝、肾组织的氧化胁迫及静止代谢率的影响。【方法】设置 1 个水体中 BPA 暴露质量浓度为 0 的空白对照组、1 个水体中 BPA 暴露质量浓度为 0 但乙醇质量分数为 0.03% 的乙醇对照组和水体中 BPA 暴露质量浓度分别为 0.5、0.9、1.8、3.6、7.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 等 5 个处理组, 处理 30 d 后测定各组实验鱼的静止代谢率, 肝组织中 BPA 的积累量及肝、肾组织中丙二醛(MDA)含量和过氧化氢酶(CAT)活性。【结果】1) 3.6 和 7.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BPA 暴露处理组的肝、肾组织中 MDA 含量比两个对照组的肝、肾组织中 MDA 含量更高, 且与后两者的差异均具有统计学意义($p < 0.05$)。2) 3.6 和 7.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BPA 暴露处理组的肝组织中 CAT 活性以及 1.8、3.6 和 7.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BPA 暴露处理组的肾组织中 CAT 活性均低于两个对照组的肝、肾组织中 CAT 活性, 与后两者的差异均具有统计学意义($p < 0.05$)。3) 1.8 和 3.6 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BPA 暴露处理组的静止代谢率高于两个对照组的静止代谢率, 7.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BPA 暴露处理组的静止代谢率低于两个对照组的静止代谢率, 上述差异均具有统计学意义($p < 0.05$)。4) 实验鱼肝组织中 BPA 积累量随水体中 BPA 暴露质量浓度的升高而升高, 表现出明显的线性正相关关系。【结论】水体 BPA 暴露质量浓度与鲤肝组织中 BPA 积累量之间具有剂量-效应关系。鲤肝、肾组织中 MDA 含量和 CAT 活性对水体 BPA 暴露相对较敏感, 肝组织比肾组织更敏感。在一定质量浓度范围内, 水体 BPA 暴露导致鲤静止代谢率升高以满足鲤在组织损伤修复和毒物净化方面额外的能量消耗, 但较高质量浓度的 BPA 暴露可能对鱼体组织器官造成损伤并引起静止代谢率下降。

关键词: 双酚 A; 鲤; 丙二醛; 过氧化氢酶; 静止代谢率

中图分类号: Q175

文献标志码: A

文章编号: 1672-6693(2019)01-0042-06

双酚 A(Bisphenol A, BPA)是有机化工生产的重要原材料。由于 BPA 被大量生产和使用, 目前在世界范围内的水环境中都可以检测到它的存在。例如, 中国水环境中的 BPA 污染正逐年增加并已在珠江、黄浦江等重要水系中被检测到^[1-3]。虽然 BPA 在水环境中的半衰期较短, 但仍能对水环境造成一定程度的影响^[4], 危及水生生物的生命健康。目前, BPA 对水环境的影响现已引起中国环境保护部门和相关人员的重视。

已有研究证明多种鱼类对水环境中的 BPA 有富集能力^[4-6], 且鱼类在特殊发育阶段如卵黄囊期, 对 BPA 的富集能力更强^[7]。近些年来, 人们已就 BPA 对水生生物的内分泌干扰、生殖毒性^[8-13]、免疫毒性^[14]、神经毒性^[15]等方面的影响做了大量研究。关于 BPA 对雌激素受体途径的影响方面更是做了重点研究, 结果表明 BPA 不仅通过雌激素受体途径对机体产生毒性作用, 而且还通过非经典受体途径及非受体途径产生毒性作用^[8-13]。本研究考察了不同质量浓度的 BPA 暴露对鲤(*Cyprinus carpio*)肝肾组织的氧化胁迫及静止代谢率的影响, 为有关环境内分泌干扰物对鱼类的毒理学效应研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用鱼购于四川省内江市李家镇养殖场, 运回实验室后进行驯化饲养 14 d。驯养水体为曝气自来水, 温度为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$, 溶氧质量浓度维持在 $5.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上, 光照条件为 12 h 光照 : 12 h 黑暗, 每日更换 1/3 体积

* 收稿日期: 2018-07-28 修回日期: 2018-09-16 网络出版时间: 2019-01-09 7:38

资助项目: 国家自然科学基金(No. 31672287)

第一作者简介: 张江惠, 男, 研究方向为鱼类生理生态学, E-mail: zzh81@qq.com; 通信作者: 袁伦强, 男, 副教授, 博士, E-mail: yuanlq@swu.edu.cn

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20190109.0731.044.html>

的驯养水体,并投喂饲料 1 次。

1.2 实验方法

驯化结束后选取生长基本一致(体质量和体长分别为 (76.2 ± 9.51) g 和 (14.2 ± 0.3) cm)、生理状况良好的鲤进行实验。通过预备实验测得 BPA 对鲤的 96 h 半致死质量浓度为 $9.07 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,安全质量浓度为 $0.91 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。按照等比法分级设置驯养水体中 BPA 质量浓度分别为 0.5, 0.9, 1.8, 3.6, 7.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 等 5 个 BPA 暴露处理组;由于 5 个 BPA 处理组水体中均使用了质量分数为 0.03% 的乙醇对 BPA 进行助溶,故设 1 个驯养水体中不含 BPA 但乙醇质量分数为 0.03% 的乙醇对照组;此外再设 1 个驯养水体中不含 BPA 和乙醇的空白对照组。每个实验组 10 尾鱼,暴露处理时间为 30 d。实验期间,实验鱼的饲料投喂量及环境条件与驯化期相同。

1.3 样品采集和测定方法

实验鱼肝、肾组织中丙二醛(MDA)含量和过氧化氢酶(CAT)活性的测定方法为:1) 取样前 1 天停止喂食,每组随机取出 5 尾实验鱼,洗净擦干体表水分,4 °C 条件下于解剖盘中迅速取肝、肾组织,用溶质质量分数为 0.7% 的生理盐水洗净再用吸水纸吸干,装入离心管内,液氮处理后置于-20 °C 冰箱留存。2) 将待测组织按质量体积比 1:9 加入 4 °C 生理溶液,4 °C 下匀浆,然后 $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液,存于 4 °C 条件下待测。3) 使用购自南京建成的 MDA、CAT 检测试剂盒检测实验鱼肝、肾组织中 MDA 含量和 CAT 活性。

采用实验室自制的鱼类流水式呼吸仪测定实验鱼静止代谢率,以曝气 2 d 后的自来水作为实验用水,水温控制在 (25 ± 1) °C。每组随机取 5 尾鱼,装入代谢呼吸室中 24 h 后,每间隔 2 h 测 1 次代谢率,共测定 5 次,取平均值。静止代谢率的计算公式为: $R = \frac{\Delta C_{O_2} \times v}{m}$,其中 R 为静止代谢率(单位: $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$); ΔC_{O_2} 为空白呼吸室与实验鱼呼吸室的溶氧质量浓度差值(单位: $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$); v 为呼吸仪水流流量(单位: $\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$); m 为鱼的体质量(单位:kg)。

用于肝组织 BPA 积累量测定的样品取自静止代谢率测定完成后的各组实验鱼肝脏,采用液-液萃取法将样本进行前处理后,在 4 °C 下保存待测,BPA 积累量的定量分析采用液相色谱法^[16],结果数据以 BPA 在肝组织中的质量分数表示。

1.4 数据处理方法

实验所得数据均采用“平均值±标准误”表示。使用 Excel 2007 软件对实验鱼肝脏中 BPA 积累量进行线性回归分析,用 SPSS 17.0 软件对实验鱼 MDA 含量、CAT 活性及静止代谢率进行单因素方差分析及 LSD 多重比较。当 $p < 0.05$ 时,上述统计结果具有统计学意义。

2 结果

2.1 肝组织中 BPA 积累量

图 1 显示,随着 BPA 暴露质量浓度的上升,实验鱼肝组织中 BPA 积累量明显增加,表现出剂量-效应关系。计算得到反映两者关系的线性回归方程为 $y = 5.0575x + 24.115$ ($n = 25$, $R^2 = 0.9373$, $p < 0.05$),其中 y, x 分别为肝组织 BPA 积累量和水体中 BPA 质量浓度。

2.2 对肝肾组织中 MDA 含量和 CAT 活性的影响

研究结果显示,空白对照组和乙醇对照组实验鱼肝肾组织中 MDA 含量和 CAT 活性均无统计学意义上的差异(图 2~图 5)。

从图 2 可见,实验鱼肝组织中 MDA 含量随 BPA 暴露质量浓度的上升而增加。0.5, 0.9 和 1.8 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

BPA 暴露处理组肝组织中 MDA 含量无统计学意义上的差异,但 1.8 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BPA 暴露处理组肝组织中 MDA 含量高于空白对照组及乙醇对照组肝组织的 MDA 含量,且与后两者的差异具有统计学意义($p < 0.05$);3.6 和 7.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BPA 暴露处理组肝组织中 MDA 含量的差异具有统计学意义($p < 0.05$),且均比两个对照组肝组织中 MDA 含量高,与后两者的差异均具有统计学意义($p < 0.05$)(图 2)。

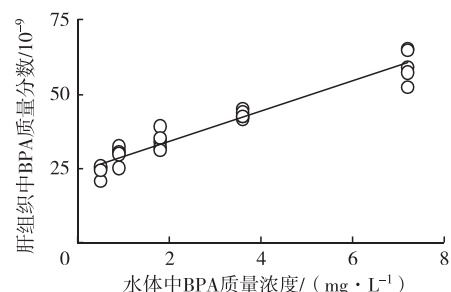
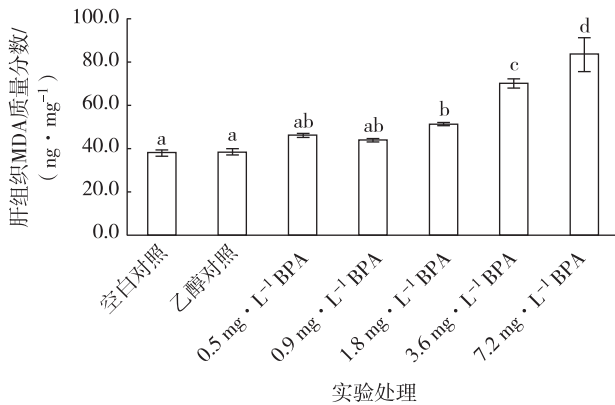


图 1 水体 BPA 暴露后鲤肝组织中 BPA 质量分数
Fig. 1 Mass fraction of bisphenol A in the liver tissue of *C. carpio* after exposure to water-borne bisphenol A

实验鱼肾组织中 MDA 含量随 BPA 暴露质量浓度的上升而增加(图 3)。从图 3 还可以看出,0.5,0.9 和 1.8 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BPA 暴露处理组以及空白对照组、乙醇对照组的肾组织中 MDA 含量均无统计学意义上的差异;3.6 和 7.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BPA 暴露处理组肾组织中 MDA 含量间无统计学意义上的差异,但均高于两个对照组肾组织中 MDA 含量,且与后两者均有统计学意义上的差异($p < 0.05$)。



注:不同字母表示组间数据差异具有统计学意义($p < 0.05$),下同

图 2 水体 BPA 暴露对鲤肝组织中 MDA 含量的影响

Fig. 2 The effect of exposure to water-borne bisphenol A on MDA content in the liver tissue of *C. carpio*

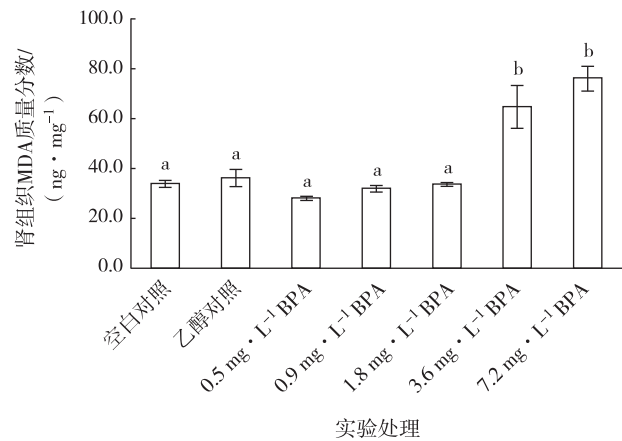


图 3 水体 BPA 暴露对鲤肾组织中 MDA 含量的影响

Fig. 3 The effect of exposure to water-borne bisphenol A on MDA content in the kidney tissue of *C. carpio*

从图 4 可见,实验鱼肝组织中 CAT 活性随 BPA 暴露质量浓度的上升表现出先升高再降低的趋势。0.5, 0.9 和 1.8 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BPA 暴露处理组以及空白对照组、乙醇对照组肝组织中 CAT 活性无统计学意义上的差异;3.6 和 7.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BPA 暴露处理组肝组织中 CAT 活性比较无统计学意义上的差异,但均低于两个对照组肝组织中 CAT 活性,且与后两者的差异均具有统计学意义($p < 0.05$)(图 4)。

图 5 显示,实验鱼肾组织中 CAT 活性随 BPA 暴露质量浓度的上升呈先升高后降低趋势。0.5 和 0.9 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BPA 暴露处理组以及空白对照组、乙醇对照组肾组织中 CAT 活性无统计学意义上的差异;1.8 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BPA 暴露处理组肾组织中 CAT 活性低于两个对照组肾组织中 CAT 活性,但高于 3.6 和 7.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BPA 暴露处理组肾组织中 CAT 活性,且 5 个组肾组织中 CAT 活性的差异均具有统计学意义($p < 0.05$);3.6 和 7.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BPA 暴露处理组肾组织中 CAT 活性无统计学意义上的差异(图 5)。

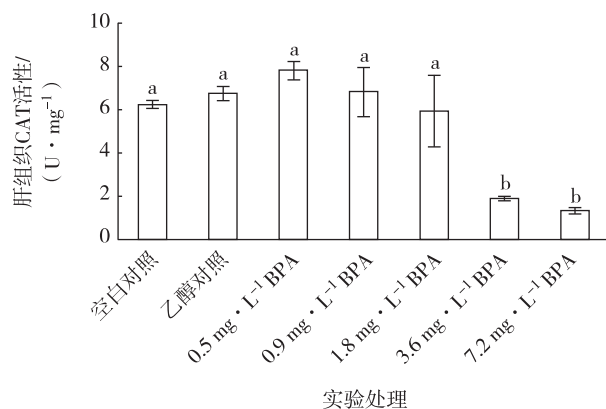


图 4 水体 BPA 暴露对鲤肝组织中 CAT 活性的影响

Fig. 4 The effect of exposure to water-borne bisphenol A on CAT activity in the liver tissue of *C. carpio*

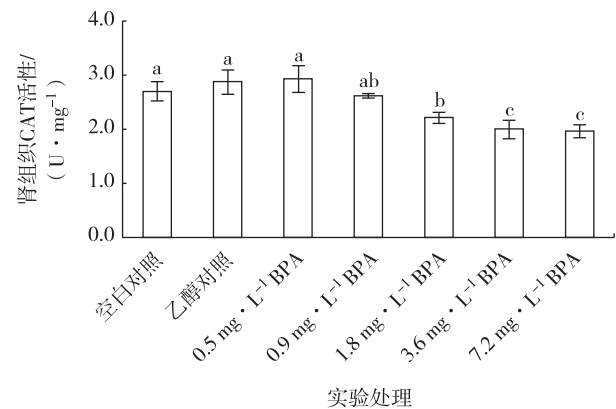


图 5 水体 BPA 暴露对鲤肾组织中 CAT 活性的影响

Fig. 5 The effect of exposure to water-borne bisphenol A on CAT activity in the kidney tissue of *C. carpio*

2.3 对静止代谢率的影响

研究结果表明,空白对照组和乙醇对照组实验鱼的静止代谢率无统计学意义上的差异,且随着 BPA 暴露质量浓度的升高,实验鱼静止代谢率先升高再降低(图 6)。图 6 还显示,0.5 和 0.9 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BPA 暴露处理组的静止代谢率分别为(111.63 ± 3.34), (121.93 ± 4.51) $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$,它们与两个对照组的静止代谢率均无统计

学意义上的差异;1.8 和 3.6 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BPA 暴露处理组的静止代谢率分别为 (135.82 ± 3.74) 和 $(143.09 \pm 8.41) \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$,两者无统计学意义上的差异,但较两个对照组的静止代谢率均有统计学意义上的升高($p < 0.05$)。7.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BPA 暴露处理组的静止代谢率为 $(96.49 \pm 4.19) \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$,低于其他 6 个组的静止代谢率,且与它们的差异具有统计学意义($p < 0.05$)。

3 讨论与结论

已有研究表明,水环境中的 BPA 可以通过直接或间接途径进入鱼类体内,而鱼类肝脏对 BPA 的富集能力最强^[4-5]。本研究中,随着 BPA 暴露质量浓度的升高,鲤肝组织中 BPA 积累量也会升高,并表现出明显的线性正相关关系。

MDA 是脂质过氧化反应后形成的降解产物之一,生物体体内 MDA 含量不仅可以反映体内脂质过氧化的速率和程度,也可间接反映体内活性氧自由基产生量及生物体氧化损伤的程度^[17-18]。本研究中,随着 BPA 暴露质量浓度的增加,实验鱼肝组织中 MDA 含量也同步增加,在较高质量浓度(1.8, 3.6 和 7.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) BPA 暴露处理组中,实验鱼肝组织 MDA 含量均比空白对照组及乙醇对照组肝组织 MDA 含量更高。这表明 BPA 使实验鱼肝组织受到氧化胁迫,鱼体内活性氧自由基的产生和清除平衡受到破坏。实验鱼肾组织 MDA 含量变化趋势与肝组织中 MDA 含量变化趋势相同,且在较高质量浓度(3.6 和 7.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) BPA 暴露处理组的肾组织也受到了 BPA 较强的氧化胁迫,诱导产生的活性氧加剧了肾组织的脂质过氧化反应。

过氧化氢是生物体代谢过程中所产生的废物,会对生物体造成损害。CAT 是生物体防御系统的关键酶,可清除代谢产生的过氧化氢,使细胞免受损害^[19-22]。有文献表明,随着 BPA 暴露质量浓度的增加和时间的延长,斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)体内 CAT 活性先增加后降低,并逐渐趋于稳定^[23],本研究中鲤的肝、肾组织中 CAT 活性也表现出类似趋势。3.6 和 7.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BPA 暴露处理组的肝组织中 CAT 活性以及 1.8, 3.6 和 7.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BPA 暴露处理组的肾组织中 CAT 活性均明显低于两个对照组肝、肾组织中的 CAT 活性。这表明鲤肝、肾组织的抗氧化系统受到 BPA 暴露干扰,抗氧化酶活性降低,抗氧化过程受到抑制。同时,由于鱼体内抗氧化酶活性降低,又导致活性氧的加速生成,从而加剧了 BPA 对鲤的氧化胁迫,进而导致 MDA 含量增加。

静止代谢率是在实验条件下鱼类保持饥饿、静止状态时测得的鱼体标准代谢率的近似值^[24],该指标的变化也可反映污染物对鱼的代谢活动的干扰^[25]。研究表明,铅、镉等重金属环境污染物进入鱼体内会干扰代谢水平^[25-27],导致鱼体耗能变化,表现为静止代谢率上升或下降。本研究显示,随着 BPA 暴露质量浓度的升高,实验鱼的静止代谢率逐渐升高,但 BPA 暴露质量浓度达到 7.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 后,实验鱼的静止代谢率开始下降。这表明 BPA 对鱼体的代谢水平具有干扰作用,而鱼体在组织修复和毒物净化活动中可能增加了代谢耗能水平;同时 BPA 暴露质量浓度过高又会对鱼体造成严重的组织损伤,因而最终不能通过生理调节应对 BPA 的干扰。

综上所述,BPA 在鲤的肝组织中存在富集效应,并表现出剂量-效应关系。BPA 暴露会影响鲤的肝、肾组织 MDA 含量和 CAT 活性,且肝组织比肾组织对 BPA 的干扰表现得更敏感。鲤受到一定质量浓度的 BPA 暴露的胁迫时,静止代谢率升高,从而满足组织损伤修复和毒物净化所需的额外能量支出;但过高的质量浓度 BPA 暴露会导致鲤组织器官受损而不能发挥正常的代谢功能。

参考文献:

- [1] GONG J, RAN Y, CHEN D, et al. Occurrence and environmental risk of endocrine-disrupting chemicals in surface waters of the Pearl river, South China[J]. Environmental Monitoring & Assessment, 2009, 156(1/2/3/4): 199-210.
- [2] WU M H, WANG L, XU G, et al. Seasonal and spatial dis-

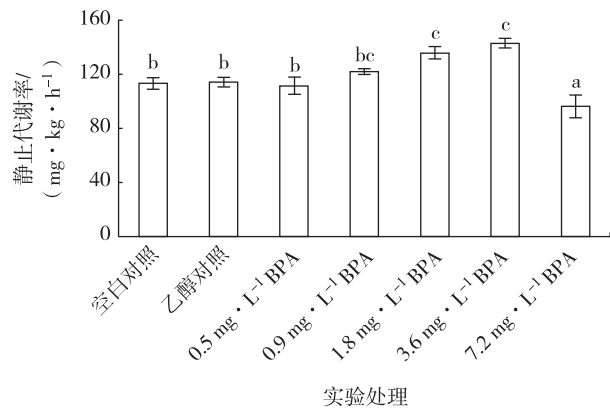


图 6 水体 BPA 暴露对鲤静止代谢率的影响

Fig. 6 The effect of exposure to water-borne bisphenol A on the resting metabolic rate of *C. carpio*

- tribution of 4-tert-octylphenol, 4-nonylphenol and bisphenol A in the Huangpu river and its tributaries, Shanghai, China [J]. Environmental Monitoring and Assessment, 2013, 185 (4): 3149-3161.

- [3] PENG X, XU Y, TANG C, et al. Occurrence of steroid es-

- trogens, endocrine-disrupting phenols, and acid pharmaceutical residues in urban riverine water of the Pearl river delta, South China[J]. *Science of the Total Environment*, 2008, 397(1/2/3):158-166.
- [4] STAPLES C A, DOME P B, KLECKA G M, et al. A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A[J]. *Chemosphere*, 1998, 36(10):2149-2173.
- [5] BELFROID A, VELZEN M V, HORST B V D, et al. Occurrence of bisphenol A in surface water and uptake in fish: evaluation of field measurements[J]. *Chemosphere*, 2002, 49(1):97-103.
- [6] LINDHOLST C, PEDERSEN K L, PEDERSEN S N. Estrogenic response of bisphenol A in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2000, 48(2/3):87-94.
- [7] HONKANEN O, HOLOPAINEN I J, KUKKONEN J V. Bisphenol A induces yolk-sac oedema and other adverse effects in landlocked salmon (*Salmo salar m. sebago*) yolk-sac fry. [J]. *Chemosphere*, 2004, 55(2):187-196.
- [8] KISHIDA M, MCLELLAN M, MIRANDA J A, et al. Estrogen and xenoestrogens upregulate the brain aromatase isoform (P450aromB) and perturb markers of early development in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Comparative Biochemistry & Physiology Part B Biochemistry & Molecular Biology*, 2001, 129(3):261-268.
- [9] SOHONI P, TYLER C R, HURD K, et al. Reproductive effects of long-term exposure to Bisphenol A in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) [J]. *Environmental Science & Technology*, 2001, 35(14):2917-2925.
- [10] LEE Y, SEO J, KIM I, et al. Endocrine disrupting chemicals (bisphenol A, 4-nonylphenol, 4-tert-octylphenol) modulate expression of two distinct cytochrome P450 aromatase genes differently in gender types of the hermaphroditic fish *Rivulus marmoratus* [J]. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 2006, 345(2):894-903.
- [11] KANG I J, YOKOTA H, OSHIMA Y, et al. Effects of bisphenol A on the reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) [J]. *Environmental Toxicology & Chemistry*, 2010, 21(11):2394-2400.
- [12] TABATA A, KASHIWADA S, OHNISHI Y, et al. Estrogenic influences of estradiol-17 beta, p-nonylphenol and bisphenol-A on Japanese medaka (*Oryzias latipes*) at detected environmental concentrations [J]. *Water Science & Technology: a Journal of the International Association on Water Pollution Research*, 2001, 43(2):109-116.
- [13] JAYNE V B, CATHERINE A H, MARTIN S, et al. Accurate prediction of the response of freshwater fish to a mixture of estrogenic chemicals [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2005, 113(6):721-728.
- [14] MILLA S, DEPIEREUX S, KESTEMONT P. The effects of estrogenic and androgenic endocrine disruptors on the immune system of fish: a review [J]. *Ecotoxicology*, 2011, 20(2):305-319.
- [15] 许海, 杨明, 吴明红. 水环境中双酚 A 污染及其对鱼类的毒性研究进展 [J]. *上海大学学报(自然科学版)*, 2013, 19(4):429-436.
- XU H, YANG M, WU M H. Bisphenol A in the aquatic environment and its toxic effects on fish [J]. *Journal of Shanghai University (Natural Science Edition)*, 2013, 19(4):429-436.
- [16] N· 勋弗尔特. 非离子表面活性剂的制造· 性能和分析 [M]. 苏聚汉, 张万福, 翁星华, 等译. 北京: 中国轻工业出版社, 1990.
- SCHONFELDT N. Grenzflächenaktive athylenoxid-addukte [M]. SU J H, ZHANG W F, WENG X H, et al. Translation. Beijing: China Light Industry Press, 1990.
- [17] 裴文慧. 环境雌激素双酚 A 对红鲤鱼 (*Cyprinus carpio*) 的免疫毒性及毒理机制研究 [D]. 上海: 上海大学, 2013.
- QIU W H. Study on immune toxicity and mechanism of bisphenol A to carp (*Cyprinus carpio*) [D]. Shanghai: Shanghai University, 2013.
- [18] 邓冬富. 水体中铅的浓度对胭脂鱼的生理生态学影响 [D]. 重庆: 西南大学, 2012.
- DENG D F. Ecophysiological effects of the water-borne lead (Pb) concentrations on Chinese sucker (*myxocyprinus asiaticus*) [D]. Chongqing: Southwest University, 2012.
- [19] 杨光, 庄惠生. 环境荷尔蒙物质双酚 A 对鲤鱼急性和亚急性毒性研究 [C] // 第二届全国环境化学学术报告会论文集. 上海: 上海交通大学, 2004.
- YANG G, ZHUANG H S. Study on the acute and subacute toxicities of bisphenol A on common carp [C] // Symposium of 2nd National Academic Conference on Environmental Chemistry. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2004.
- [20] 张景飞, 王晓蓉. 2,4-二氯苯酚低浓度长期暴露对鲫鱼肝脏抗氧化系统的影响 [J]. *环境科学*, 2003, 24(5):136-140.
- ZHANG J F, WANG X R. Effects of long-term exposure of low-level 2,4-Dichlorophenol on the antioxidant defense system in liver of *Carassius auratus* [J]. *Environmental Science*, 2003, 24(5):136-140.
- [21] 徐镜波, 景体淞. M-DNB 和 P-DNB 对鲤鱼肝脏过氧化氢酶的影响 [J]. *中国环境科学*, 1998, 18(1):57-59.
- XU J B, JING T S. Effects of M-DNB and P-DNB on liver catalase activity of carp [J]. *China Environmental Science*, 1998, 18(1):57-59.
- [22] RODRIGUEZARIZA A, PEINADO J, PUEYO C, et al. Biochemical indicators of oxidative stress in fish from pol-

- luted littoral areas[J]. Canadian Journal of Fisheries & Aquatic Sciences, 1993, 50(12):2568-2573.
- [23] MATHERMIHAICH E, DI G R. Oxidant, mixed-function oxidase and peroxisomal responses in channel catfish exposed to a bleached kraft mill effluent[J]. Archives of Environmental Contamination & Toxicology, 1991, 20(3): 391-397.
- [24] XIE X, SUN R. The Bioenergetics of the southern catfish (*Silurus meridionalis* Chen). I. resting metabolic rate as a function of body weight and temperature[J]. Physiological Zoology, 1990, 63(6):1181-1195.
- [25] MAGER E M, Grosell M. Effects of acute and chronic waterborne lead exposure on the swimming performance and aerobic scope of fathead minnows (*Pimephales promelas*) [J]. Comparative Biochemistry & Physiology Part C, 2011, 154(1):7-13.
- [26] SOMERO G N, YANCEY P H, CHOW T J, et al. Lead effects on tissue and whole organism respiration of the estuarine teleost fish, *Gillichthys mirabilis* [J]. Archives of Environmental Contamination & Toxicology, 1977, 6(2/3):349-354.
- [27] FERRARI L, EISSA B L, SALIBIÁN A. Energy balance of juvenile *Cyprinus carpio* after a short-term exposure to sublethal water-borne cadmium[J]. Fish Physiology & Biochemistry, 2011, 37(4):853-862.

Animal Sciences

Effects of the Exposure to Water-Borne Bisphenol A on Oxidative Stress of the Liver and Kidney and Resting Metabolic Rate in *Cyprinus carpio*

ZHANG Jianghui, WU Guangjie, TANG Wanqin, YUAN Lunqiang

(Key Laboratory of Freshwater Fish Reproduction and Development of Ministry of Education, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: [Purposes] This study aimed to determine the oxidative stress effects of water-borne bisphenol A on the liver and kidney and the resting metabolic rate of *Cyprinus carpio*. [Methods] A blank control group (0 mg · L⁻¹), an alcohol control group (BPA content is 0 and alcohol content is 0.03%), and five exposure groups (0.5, 0.9, 1.8, 3.6, and 7.2 mg · L⁻¹) were designed. After 30 days of exposure, the malondialdehyde (MDA) content and the catalase (CAT) activity in the liver and kidney, and the resting metabolic rate were determined. [Findings] 1) MDA contents in the liver and kidney of 3.6 and 7.2 mg · L⁻¹ exposure groups were higher than those of the blank and alcohol control group, with statistically significant difference ($p < 0.05$). 2) The CAT activities in the liver of the 3.6 and 7.2 mg · L⁻¹ exposure groups were lower than those in the blank and alcohol control group, while the CAT activities in the kidney of 1.8, 3.6, and 7.2 mg · L⁻¹ exposure groups were lower than those of the blank and alcohol control group, with statistically significant difference ($p < 0.05$). 3) The resting metabolic rates of 1.8 and 3.6 mg · L⁻¹ exposure groups were higher, but the resting metabolic rate of 7.2 mg · L⁻¹ exposure group was lower than those of the blank and alcohol control group, with statistically significant difference ($p < 0.05$). 4) The accumulation of BPA in the liver increased with the increase of the exposure concentration of BPA in water showing a significant linear positive correlation. [Conclusions] There is a dose-effect relationship between the water-borne bisphenol A and the accumulation of bisphenol A in liver of *C. carpio*. The content of MDA and CAT activity in liver and kidney of *C. carpio* are sensitive to the exposure of water-borne bisphenol A, especially more sensitive in liver than in kidney. The resting metabolic rate of the fish exposed to bisphenol A increases to meet the additional energy consumption of tissue damage repair and toxic decontamination, but exposure to higher concentration of bisphenol A may damage the tissues and organs of fish and reduce its resting metabolic rate.

Keywords: bisphenol A; *Cyprinus carpio*; malondialdehyde; catalase; resting metabolic rate

(责任编辑 方 兴)

中国境内野生穿山甲现状及非法贸易概况*

郭珊珊, 彭建军, 刘双, 刘萍
(重庆师范大学 生命科学学院, 重庆 401331)

摘要:【目的】为更加有效地保护穿山甲(*Manis* sp.)现有野生种群和抑制穿山甲非法贸易的相关工作提供参考资料。【方法】通过文献查阅对中国境内野生穿山甲种群数量现状、分布情况进行整理分析;利用百度搜索引擎,以“穿山甲”、“查获”、“走私贸易”等关键词查询网页、CNKI等数据库中1999—2017年中国穿山甲非法贸易相关报道,收集查获数量、涉及城市等相关数据,并对1999—2017年中国非法贸易情况以及贸易路线进行分析概括。【结果】中国各地野生穿山甲数量和分布范围却迅速缩减。在查询到的394起有关穿山甲非法贸易的案件中,共计查获穿山甲活体3 585只,死体22 925只,甲片35 072.71 kg。相关案件涉及全国23个省(直辖市、自治区、特别行政区),云南、广西、广东等地为非法贸易多发地,报道案件数分别占报道案件总数的26.14%、25.13%和17.26%。非法贸易方式主要为海运和陆运方式,陆运途径具体路线为:缅甸—云南—其他地区、越南—广西和云南—其他地区。海运途径具体路线为:香港—广东—其他地区和马来西亚—广东。【结论】为有效遏制穿山甲数量急剧下降的事态和恢复穿山甲野生种群,建议:1)加快穿山甲人工繁育工作进程,加强人工辅助下的种群扩散研究工作,对穿山甲灭绝区域进行重新引入穿山甲的工作;2)加强穿山甲生境恢复工作;3)加快穿山甲甲片活性成分分析以及人工合成替代物研究进程;4)加大对云南、广西边境地区以及广东沿海地区非法贸易打击力度,与周边国家合作打击穿山甲非法贸易;5)加强对穿山甲保护相关的公约、法规以及穿山甲在防止白蚁危害、维护生态平衡等生态价值的宣传。

关键词:穿山甲;种群数量;非法贸易

中图分类号:Q16

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2019)01-0048-07

穿山甲(*Manis* sp.)为哺乳纲(Mammalia)、鳞甲目(Pholidota)、穿山甲科(Manidae)动物,在全球呈现濒危或极度濒危状态^[1]。人类对穿山甲个体的狩猎捕获、人类活动对穿山甲野外栖息地的大规模破坏、国际上有关穿山甲的非法贸易等均是引起穿山甲野生种群数量下降的重要因素^[2]。因此,全球现存穿山甲物种均于2016年被列入《濒危野生动植物种国际贸易公约》(CITES)附录I中,2017年中国实施的新版《野生动物保护法》也禁止对穿山甲等国家一级保护野生动物的猎杀、贩卖以及购买^[3]。为了向更加有效地保护穿山甲现有野生种群和抑制穿山甲非法贸易的相关工作提供参考资料,笔者通过文献查阅,对中国境内野生穿山甲种群数量现状、分布情况进行了整理分析;并利用百度搜索引擎,以“穿山甲”、“查获”、“走私贸易”等关键词查询1999—2017年间在互联网、CNKI等数据库中穿山甲非法贸易相关的网页新闻、法律文书、海关公布案件等报道,通过收集查获数量、涉及城市等相关数据,对1999—2017年涉及穿山甲非法贸易情况以及贸易路线进行了分析概括;最后对目前穿山甲的保护工作提出了建议。

1 中国境内野生穿山甲现状

全球现存的穿山甲有8种^[4],主要分布于亚洲和非洲各国。现有化石纪录以及相关研究显示穿山甲可能起源于欧洲^[5]。杨立^[6]根据现已发现的穿山甲和白蚁化石,结合当时气候以及地质条件推测了穿山甲可能的迁移过程,并认为:始新世时穿山甲由欧洲逐渐扩散至北美、亚洲和非洲;随后由于中新世至上新世逐渐变冷的气候以及更新世时期冰期与间冰期交替出现引起温度剧烈地变化,导致分布于欧洲和北美的穿山甲灭绝;同时,残余

* 收稿日期:2017-07-15 修回日期:2018-12-16 网络出版时间:2019-01-09 7:37

资助项目:国家自然科学基金(No. 31470570);重庆市自然科学基金(No. cstc2014jcyjA80013);重庆市教育委员会科学技术研究计划项目(No. kj1400534);重庆市研究生科研创新项目(No. CYS15155)

第一作者简介:郭珊珊,女,研究方向为生态学与动物保护生物学,E-mail: 819292511@qq.com;通信作者:彭建军,男,教授,博士,E-mail: jipeng74@163.com

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20190109.0731.012.html>

的穿山甲向食物资源更为丰富、气候条件也更加温热潮湿的亚非两洲的部分地区迁移并逐渐形成现今穿山甲的分布格局。中国境内共分布 3 种穿山甲,其中印度穿山甲(*Manis crassicaudata*)和马来穿山甲(*Manis javanica*)狭窄分布于云南部分地区且数量稀少,中华穿山甲(*Manis pentadactyla*)数量多、分布范围广,为中国主产穿山甲^[4,7]。中华穿山甲被分为 3 个亚种:指名亚种(*M. pentadactyla*)、华南亚种(*M. pentadactyla aurita*)和海南亚种(*M. pentadactyla pusilla*),分布区域包括广东、广西、云南、福建、重庆等 18 个省(直辖市、自治区)^[8]。此外,中国周边的 8 个国家如缅甸、老挝、泰国、越南、印度等也有少量中华穿山甲分布^[9]。

1960 年至今,中国境内野生穿山甲的种群数量以及分布范围急剧缩减。从有关广东、福建等穿山甲数量较多的省份的报道可知:广东省野生穿山甲数量已由 1960 年的 100 000 余头减少至 2000 年的 5 863~14 273 头^[10],总量下降了 85% 以上;2008 年全国穿山甲野外种群数量快速评估的结果显示,广东等省野外已经很少见到穿山甲实体^[11]。1960 年福建省穿山甲的捕获量为 20 000 头^[1],按照野外捕获量:总量为 1:5 推算^[12],估计总量为 100 000 头左右,而 1994 年则总量下降为 20 000 头,下降了约 80%;分布地也由最初的全省各地除厦门市外均有分布缩减至只存在于南平、三明、龙岩等 3 地的林业保护区内^[12]。其他地区野生穿山甲分部情况也不容乐观,2016 年余经裕等人^[13]对重庆市 14 个区县做了行程为 80 km 的调查,所有样线均未发现穿山甲的新鲜洞穴;同年的一项调查结果也显示,海南省穿山甲仅存在于霸王岭、鹦哥岭等 6 个自然保护区内^[14]。

此外,根据文献查阅结果以及对 1980—2016 年全国五大药材市场穿山甲甲片价格进行统计分析^[15-37],得到的结果如图 1 所示。从该图可以看出穿山甲甲片价格逐年上涨,除略有小幅波动以外,已由 1980 年 10 元·kg⁻¹ 上涨至 2016 年的 2 750 元·kg⁻¹,这间接反映出野生穿山甲种群数量的迅速下降。刘逊等人^[38]对五大药市之一的安徽省亳州药材市场穿山甲商品药材调查鉴定结果也表明:国内穿山甲野生种群数量已十分稀少,药材市场穿山甲甲片供给主要来源于其他国家的穿山甲。

活体穿山甲的价格也因野生种群数量稀少由 2008 年的 80 美元·kg⁻¹ 上涨至 2014 年的 200 美元·kg⁻¹^[39]。为了更加有效地保护野生穿山甲现有种群,2016 年 9 月 29 日 8 种穿山甲均被列入 CITES 附录 I,该规定已于 2017 年 1 月 2 日生效,即穿山甲及其相关衍生物均已被禁止国际贸易,目前药材市场也只能对规定生效前的甲片进行适当贸易^[3]。

2 穿山甲非法贸易现状与路线

自 1975 年起,世界各国通过和颁布了一系列的国际公约、法律法规来限制穿山甲贸易,以期达到保护该属所有物种的目的,但野生穿山甲非法贸易仍频繁发生。2004—2014 年,超过 100 万只穿山甲被用于非法贸易,穿山甲现已与象、虎并列成为世界上受非法贸易严重影响的三大哺乳动物^[40]。

1990 年以后,大量的穿山甲及其甲片从越南、缅甸、老挝等国家流入中国^[15,38]。另据有关文献统计,2009—2014 年间,从亚洲其他国家和非洲有 7.25 t 穿山甲甲片流入中国^[41]。这些流入中国的穿山甲及其甲片中,除一部分来源于当时的国际公约及法律法规允许的合法贸易外,另一部分来源于走私等非法贸易。根据相关报道并结合程文达等人^[42]的统计结果,对 1999—2017 年国内穿山甲非法贸易情况进行补充统计,结果显示已知的穿山甲非法贸易案件约 394 起,查获穿山甲活体 3 585 只,死体 22 925 只,甲片 35 072.71 kg(表 1),涉及云南、广东、广西、福建、浙江、上海、湖南、山东、江苏、北京、海南、河南、香港、江西、四川、西藏、贵州、天津、台湾、安徽、重庆、陕西、新疆等 23 个省(直辖市、自治区和特别行政区)(图 2)。图 2 中可以看出,穿山甲非法贸易案件查获地点多集中在云南、广东、广西等 3 省(自治区),查获次数分别占总案件数的 26.14%、25.13% 和 17.26%。因此这 3 省(自治区)为穿山甲非法贸易案件高发地带,这应该与它们的地理位置密切相关。广西与云南地处中国边境,与老挝、缅甸、越南等 3 国接壤,在漫长的边界线上有着众多的港口、码头以及省道可为野生动物非法贸易所利用^[43]。据统计,2005—2011 年仅云南西部边境地区野生动物非法贸易数量就高达 28 993 只^[44];而据更早时期

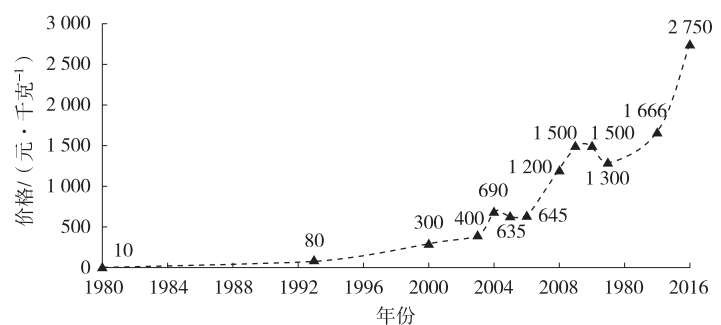


图 1 1980—2016 年国内药材市场穿山甲甲片价格走势

Fig. 1 The price trend of pangolin scale in Chinese medicine market from 1980 to 2016

的一项研究调查发现,1993—1996年在广西每天约有 2.29~29.32 t 野生动物非法入境^[45]。此外,广州市作为沿海城市,地处三江汇合处,水运十分发达,且有着全国最大的野生动物贸易集散地。

进一步对查获数量进行分析,如按 1 只穿山甲含甲片 0.36~0.57 kg 来计算^[46],则由上述统计得到的穿山甲甲片查获量 35 072.71 kg 可折算成穿山甲的个体数约为 61 531~97 424 只;加上穿山甲死体的查获量 22 925 只,两者总和远远高于 3 585 只的活体查获量。而对广西和广东两地中查获的穿山甲非法贸易类型进行分析后可以发现两地穿山甲甲片与穿山甲死体被查获的次数最多,分别为在两地被查获总次数的 43.62%和 32.25%。这与穿山甲死体便于走私伪装而活体运输困难密切相关。例如在印度,被非法捕捉的野生穿山甲通常经屠宰后,可食用部分被运往当地市场进行销售,甲片则经中间商辗转缅甸、尼泊尔等地最终通过走私流入中国^[47]。在查获的案件中,穿山甲冻体多冠以普通海产品或者冷冻品之名进行装箱走私,且走私数量巨大。

对上述 394 起穿山甲非法贸易案件报道查获地与来源地的数据进行统计分析,结果显示其中仅有 132 起案件有来源地报道;来源地包括缅甸、越南、巴基斯坦等 11 个亚洲国家和几内亚、喀麦隆、安哥拉等 6 个非洲国家。缅甸来源的穿山甲非法贸易案件的查获次数最高,共 31 起,占有来源地报道案件总数的 23.48%;越南缅甸来源的相关案件的查获次数次之,共 19 起,占有来源地报道案件总数的 16.67%。而云南、广东和广西作为国内穿山甲非法贸易案件的高发地带,既是穿山甲非法贸易的终极目的地,也是穿山甲非法转运至国内其他地区如福建、安徽、湖南、四川等地的中转站。穿山甲非法流入途径主要分为陆运和海运两种,少数通过航空、邮寄等方式。陆运途径具体路线为:缅甸—云南(主要为昆明市)—其他地区(如成都市、河北省安国市、安徽省亳州市、长沙市、广州市)或者越南—广西(主要为防城港市或东兴市)、云南(主要为昆明市)—其他地区(如郑州市、福州市、上海市、杭州市、长沙市)。海运途径具体路线为:香港—广东(主要为广东省深圳市)—其他地区(主要为广州市)或者马来西亚—广东(主要为广州市)。

3 关于加强穿山甲保护工作的建议

在穿山甲甲片以及活体非法贸易的高额利润的刺激下,处在繁殖期的穿山甲野生个体常被视为易于捕捉的对象^[48],此外穿山甲抵御外敌能力低下、产子数量少且难以存活^[49-50]等因素也导致穿山甲种群数量增长率远低于被捕捉率,穿山甲数量下降的进程也因此加快。日渐频繁的人类活动对穿山甲生存环境的改变和破坏也导致上述情况更加严峻。2004 年的一项研究就已表明,当时国内栖息地中穿山甲的生态密度已低至 0.001~0.050 头·km⁻²^[51],这对于穿山甲的生存繁衍极为不利。此外,过去如马来西亚、缅甸等一些穿山甲原产地国家的法律法规不甚健全甚至缺乏或者由于财政、人力以及相关单位监管力度和法律执行能力等方面的不足也使得穿山

表 1 1999—2017 年中国非法贸易穿山甲查获数据

Tab. 1 The seizure data of pangolins and scales in China from 1999 to 2017

年份	活体/只	死体/只	甲片/kg	年份	活体/只	死体/只	甲片/kg
1999	41	0	0.00	2010	94	2 195	1 968.50
2001	110	8	893.00	2011	329	8	2 918.05
2002	27	0	0.00	2012	943	2 930	529.58
2004	89	3 116	1 527.50	2013	458	3 543	3 230.90
2003	241	0	750.00	2014	179	1 716	3 561.49
2005	76	465	603.70	2015	161	2 842	7 164.72
2006	64	3 735	1 640.00	2016	312	37	5 128.16
2007	58	82	1 660.00	2017	28	5	16.68
2008	247	2 147	2 251.25	合计	3 585	22 925	35 072.71
2009	128	96	1 229.18				

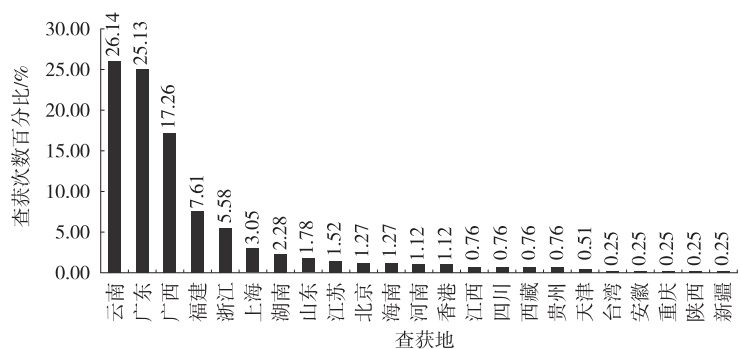


图 2 1999—2017 年中国穿山甲非法贸易案件查获地与查获次数百分比

Fig. 2 The percentage of seizure numbers of illicit trade in pangolin and seizure locations in China from 1999 to 2017

甲非法贸易的情况更为严重^[52-53]。为了有效遏制现有穿山甲数量急剧下降的事态,恢复穿山甲野外种群的数量,对穿山甲进行有效保护在当前已是迫在眉睫。对此,笔者就加强穿山甲保护工作提出以下几点建议:

1) 加快穿山甲人工繁育的工作进程,加强人工辅助下的种群扩散研究工作,对穿山甲灭绝区域进行重新引入穿山甲的工作。进行穿山甲人工繁育能够对穿山甲野外种群的保护和恢复产生积极的作用。虽然 1859 年起全球各地的动物科研和保育机构就开始尝试进行穿山甲的人工饲养繁殖工作^[54-57],但目前相关机构仍未具有为大规模进行人工繁育提供种源的能力。这主要受限于野外引种的穿山甲拒食和感染肺部疾病、寄生虫等一系列导致穿山甲个体死亡的因素。因此,更加深入开展有关穿山甲人工养殖中繁殖参数、流行病学、食谱优化等方面的研究对于成功进行穿山甲人工繁育显得尤其重要。

2) 加强恢复穿山甲的生境工作。穿山甲的生境恢复主要涉及食物资源和森林群落结构两方面。穿山甲主要以白蚁(Termitidae)为食,可通过人工种植白蚁喜食的树木来保障穿山甲的食物资源;此外,人工种植部分灌木等也可对穿山甲生境内的森林群落进行恢复,为穿山甲的隐蔽、生长、繁殖等提供有利的条件。

3) 积极推进对穿山甲甲片有效成分进行深入分析和寻求人工合成替代品的工作。穿山甲甲片为传统医学处方常用动物药之一,但以往对于穿山甲甲片的研究仅限于药理作用、临床疗效以及所含化学成分的研究,对于其中具体起到治疗效果的活性成分知之甚少。在当前国际穿山甲贸易已被明令禁止且国内法规加强对穿山甲的保护的大氛围下,深入开展穿山甲甲片有关治疗效果活性成分的研究将有助于人工合成替代品的开发工作,从而进一步推动穿山甲的保护工作。

4) 加大对如云南、广西、广州等地的边境以及沿海地区穿山甲走私贸易的监督管理,扩大与其他国家的合作范围联合打击穿山甲非法贸易。有效解决和改善边境居民的民生问题,转变某些地方过去主要依靠野生动物贸易的经济发展方式。

5) 加强各地尤其是野生动物消费大区的有关穿山甲保护的法律法规和科普知识宣传。普及穿山甲在维持生态平衡、防止白蚁危害等方面的重要作用的相关知识,加大对 CITES 新规和《野生动物保护法》宣传,让民众了解并认识到穿山甲已处在极度濒危状况,不仅国际上已禁止相关贸易,国内也已出台相关法律禁止非法捕杀、销售、购买穿山甲等国家濒危动物以及相关制品,让人们不再食用穿山甲及将穿山甲相关制品用于药用,并自觉形成保护穿山甲的思想意识。

参考文献:

- [1] 汪松. 中国濒危动物红皮书(兽类)[M]. 北京:科学出版社, 1998:136-198.
WANG S. China red data book of endangered animals (Mammal) [M]. Beijing: Science Press, 1988:136-198.
- [2] 尹峰, 卢琳琳, 梦梦, 等. 穿山甲的贸易和保护[J]. 野生动物学报, 2016, 37(2): 157-161.
YIN F, LU L L, MENG M, et al. Trade and conversation of pangolin[J]. Chinese Journal of Wildlife, 2016, 37(2): 157-161.
- [2] 杨强. 国家林业局:穿山甲升 CITES 附录 I 生效, 食用或面临刑罚[EB/OL]. (2017-02-24) [2017-06-15]. https://www.thepaper.cn/newsDetail_forward_1626387.
Yang Q. State forestry bureau: pangolins are listed in CITES appendix I as valid, eating pangolins will be punished [EB/OL]. (2017-2-24) [2017-06-15]. https://www.thepaper.cn/newsDetail_forward_1626387.
- [4] 胡锦涛. 哺乳动物学[M]. 北京:中国教育文化出版社, 2007:232.
HU J C. Mammalogy[M]. Beijing: China Education Culture Publishing House, 2007:232.
- [5] GAUDIN T J, EMRY R J, WIBLE J R. The phylogeny of living and extinct pangolins (*Mammalia, Pholidota*) associated taxa: a morphology based analysis [J]. Journal of Mammalian Evolution, 2009, 16(4): 235-305.
- [6] 杨立. 鳞甲目(Pholidota)起源与演化的化石证据及马来穿山甲(*Manis Javanica*)种群结构分析[D]. 广州:华南师范大学, 2014.
YANG L. Fossil evidence for the evolution of Pholidota and analysis of the population struction of *Manis Javanica* [D]. Guangzhou: South China Normal University, 2014.
- [7] 吴诗宝, 王应祥, 冯庆. 中国兽类一新纪录: 爪哇穿山甲(*Mains Javanica*) [J]. 动物分类学报, 2005, 30(2): 440-443.
WU S B, WANG Y X, FENG Q. A New record of mammalia in China: *Manis Javanica* [J]. Acta Zootaxonomica Sinica, 2005, 30(2): 440-443.
- [8] 王应祥. 中国哺乳动物种和亚种分类名录与分布大全[M]. 北京:中国林业出版社, 2003:69.
WANG Y X. A complete checklist of mammal species and subspecies in China [M]. Beijing: China Forestry Publishing House, 2003:69.
- [9] CHALLENGER D, BAILLIE J, ADES G, et al. *Manis pen-*

- tadactyla the IUCN red list of threatened species [EB/OL]. [2017-06-15]. <http://www.iucnredlist.org/details/12764/0>.
- [10] 吴诗宝,马广智,唐玫,等. 广东省穿山甲种群数量调查与资源蕴藏量[J]. 兽类学报,2002,22(4):270-276.
WU S B, MA G Z, TANG M, et al. The population and density of pangolin in Dawuling natural reserve and the number of pangolin resource in Guangdong province[J]. Acta Theriologica Sinica, 2002, 22(4): 270-276.
- [11] PANTEL S, CHIN S Y. Proceedings of the workshop on trade and conservation of pangolins native to South and Southeast Asia[C]. Petaling Jaya, Selangor, Malaysia: TRAF-FIC Southeast Asia, 2009:103-105.
- [12] 周冬良. 福建省穿山甲资源现状及保护管理对策[J]. 福建林业科技, 1996(2):85-88.
ZHOU D L. Present situation and countermeasures of the protection and management of *Mains pentadactyla* in Fujian province[J]. Journal of Fujian Forestry, 1996(2): 85-88.
- [13] 余经裕,彭建军,廖国宇. 重庆市中华穿山甲的生态地理分布及资源现状调查初报[J]. 林业实用技术, 2016(6): 41-43.
YU J Y, PENG J J, LIAO G Y. The geographical distribution and resource of Chinese pangolin (*Manis pentadactyla*) in Chongqing[J]. Forest Science and Technology, 2016(6): 41-43.
- [14] NASH H C, WONG M H G, TURVEY S T. Using local ecological knowledge to determine status and threats of the critically endangered Chinese pangolin (*Manis pentadactyla*) in Hainan China[J]. Biological Conservation, 2016, 196:189-195.
- [15] 杨立权,迟程,迟萍. 穿山甲的研究概况与展望[J]. 云南中医学院学报, 1994(4):46-50.
YANG L Q, CHI C, CHI P. The research situation and prospects of pangolin[J]. Journal of Yunnan University of Traditional Chinese medicine, 1994(4): 46-50.
- [16] 丁乡. 穿山甲价格上扬[J]. 农村百事通, 2000(21):16-17.
DING X. The price of pangolin moves up[J]. Agriculture Guide, 2000(21): 16-17.
- [17] 《吉林畜牧兽医》编辑部. 10 种动物药材价格走高[J]. 吉林畜牧兽医, 2003(2):42.
Editorial Department of Jilin Animal Husbandry and Veterinary Medicine. The price of 10 animal medicinal materials goes up[J]. Jilin Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2003(2): 42.
- [18] 丁立威,丁乡. 国内四大药市中药材最新市场行情[J]. 特种经济动植物, 2004,7(10):20-21.
DING L W, DING X. The latest situation of Chinese medicinal herbs in the four domestic markets[J]. Special Economic Animal and Plants, 2004, 7(10): 20-21.
- [19] 丁乡,丁立威. 国内四大药市中药材近期市场行情[J]. 特种经济动植物, 2005,8(1):19-20.
DING X, DING L W. The recent situation of Chinese medicinal herbs in the four domestic markets[J]. Special Economic Animal and Plants, 2005, 8(1): 19-20.
- [20] 尹平孙,丁立威,丁乡. 国内四大药市中药材近期市场行情[J]. 特种经济动植物, 2005,8(2):20-21.
YIN P S, DING L W, DING X. The recent state of Chinese medicinal herbs in the four domestic markets[J]. Special Economic Animal and Plants, 2005, 8(2): 20-21.
- [21] 赵喜进,赵帅,丁立威,等. 国内四大药市中药材近期市场行情[J]. 特种经济动植物, 2005,8(3):24-25.
ZHANG X J, ZHAO S, DING L W, et al. The recent quotation of Chinese medicinal herbs in the four domestic markets[J]. Special Economic Plants, 2005, 8(3): 24-25.
- [22] 赵喜进,赵帅,丁立威,等. 国内四大药市中药材近期市场行情[J]. 特种经济动植物, 2005,8(4):18-19.
ZHAO X J, ZHAO S, DING L W, et al. The recent state of Chinese medicinal herbs in the four domestic markets [J]. Special Economic Animal and Plants, 2005, 8(4): 18-19.
- [23] 丁立威. 国内四大药市中药材近期市场行情[J]. 特种经济动植物, 2005,8(8):17-18.
DING L W. The recent level of Chinese medicinal herbs in the four domestic markets[J]. Special Economic Animal and Plants, 2005, 8(8): 17-18.
- [24] 丁乡. 20 种动物药材走畅[J]. 农民科技培训, 2005(8): 42.
DING X. 20 animal medicinal materials are much in demand[J]. Science and Technology Training of Farmers, 2005(8): 42.
- [25] 尹平孙. 国内四大药市部分中药材近期市场行情[J]. 特种经济动植物, 2006,9(2):23-24.
YING P S. The latest situation of Chinese medicinal herbs in the four pharmaceutical markets[J]. Special Economic Animal and Plants, 2006, 9(2): 23-24.
- [26] 赵喜进,赵帅. 国内四大药市部分中药材近期市场行情[J]. 特种经济动植物, 2006,9(3):21-22.
ZHAO X J, ZHAO S. The latest quotation of Chinese medicinal herbs in the four pharmaceutical markets[J]. Special Economic Animal and Plants, 2006, 9(3): 21-22.
- [27] 丁立威. 国内四大药市部分中药材近期市场行情[J]. 特种经济动植物, 2006,9(5):16-17.
DING L W. The recent level of partial Chinese medicinal herbs in the four domestic markets[J]. Special Economic Animal and Plants, 2006, 9(5): 16-17.
- [28] 赵喜进,赵帅,丁立威,等. 国内五大药市部分中药材近期市场行情[J]. 特种经济动植物, 2008,11(4):31-33.

- ZHAO X J, ZHAO S, DING L W et al. The latest quotation of Chinese medicinal herbs in the five pharmaceutical markets[J]. *Special Animal and Plants*, 2008, 11(4): 31-33.
- [29] 赵喜进, 赵帅, 尹平孙, 等. 国内五大药市部分中药材近期市场行情[J]. *特种经济动植物*, 2008, 11(6): 27-29.
ZHAO X J, ZHAO S, YIN P S, et al. The recent state of Chinese medicinal herbs in the four domestic markets[J]. *Special Economic Plants*, 2008, 11(6): 27-29.
- [30] 丁立威, 尹平孙. 国内六大药市部分中药材近期市场行情[J]. *特种经济动植物*, 2010, 13(1): 24-27.
DING L W, YIN P S. The recent level of partial Chinese medicinal herbs in the six domestic markets[J]. *Special Economic Animal and Plants*, 2010, 13(1): 24-27.
- [31] 赵喜进, 赵帅, 丁立威, 等. 国内六大药市部分中药材近期市场行情[J]. *特种经济动植物*, 2010, 13(5): 22-25.
ZHAO X J, ZHAO S, DING L W, et al. The recent state of partial Chinese medicinal herbs in the six domestic markets[J]. *Special Economic Plants*, 2010, 13(5): 22-25.
- [32] 赵喜进, 赵帅, 丁立威, 等. 国内六大药市部分中药材近期市场行情[J]. *特种经济动植物*, 2010, 13(9): 23-26.
ZHAO X J, ZHAO S, DING L W, et al. The recent state of partial Chinese medicinal herbs in the six domestic markets[J]. *Special Economic Plants*, 2010, 13(9): 23-26.
- [33] 尹平孙, 丁立威, 赵喜进, 等. 国内五大药市部分中药材近期市场行情[J]. *特种经济动植物*, 2012, 15(1): 22-24.
YING P S, DING L W, ZHAO X J, et al. The latest situation of partial Chinese medicinal herbs in the five pharmaceutical markets[J]. *Special Animal and Plants*, 2012, 15(1): 22-24.
- [34] 尹平孙, 丁立威, 赵喜进, 等. 国内五大药市部分中药材近期市场行情[J]. *特种经济动植物*, 2014, 17(2): 27-29.
YING P S, DING L W, ZHAO X J, et al. The latest situation of partial Chinese medicinal herbs in the five pharmaceutical markets[J]. *Special Economic Animal and Plants*, 2014, 17(2): 27-29.
- [35] 尹平孙, 丁立威, 赵喜进, 等. 国内五大药市部分中药材近期市场行情[J]. *特种经济动植物*, 2014, 17(11): 24-26.
YING P S, DING L W, ZHAO X J, et al. The latest situation of partial Chinese medicinal herbs in the five pharmaceutical markets[J]. *Special Economic Animal and Plants*, 2014, 17(11): 24-26.
- [36] 尹平孙, 丁立威, 赵喜进, 等. 国内五大药市部分中药材近期市场行情[J]. *特种经济动植物*, 2014, 17(12): 17-19.
YING P S, DING L W, ZHAO X J, et al. The latest situation of partial Chinese medicinal herbs in the five pharmaceutical markets[J]. *Special Economic Animal and Plants*, 2014, 17(12): 17-19.
- [37] 尹平孙, 李晓微, 赵喜进, 等. 国内五大药市部分中药材近期市场行情[J]. *特种经济动植物*, 2016, 19(7): 31-33.
YING P S, ZHAO X W, ZHAO X J, et al. The latest situation of partial Chinese medicinal herbs in the five pharmaceutical markets [J]. *Special Economic Animal and Plants*, 2016, 19(7): 31-33.
- [38] 刘逊, 朱缨, 胡芳, 等. 濒危物种穿山甲的商品调查及其基源鉴定[J]. *亚太传统医药*, 2015, 11(15): 35-36.
LIU X, ZHU Y, HU F, et al. Endangered species surveys and pangolin products based source identification[J]. *Asia-Pacific Traditional Medicine*, 2015, 11(15): 35-36.
- [39] ZHOU Z M, MACDONSLD D W. Scaling up pangolin protection in China[J]. *Frontiers in Ecology & the Environment*, 2014, 12(2): 97-98.
- [40] 王琳琳. 消费阴影笼罩穿山甲[N]. *中国环境报*, 2006-05-10(8).
WANG L L. The wildlife consumption hovers over the pangolin [N]. *China Environment News*, 2006-05-10(8).
- [41] CHALLENGER D W, HARROP S R, MACMILLAN D C. Understanding markets to conserve trade-threatened species in CITES[J]. *Biological Conservation*, 2015, 187: 249-259.
- [42] CHENG W D, XING S, BONEBRAKE T C. Recent pangolin seizures in China reveal priority areas for intervention[J]. *Conservation Letters*, 2017, 10(6): 757-764.
- [43] ZHANG L, HUA N, SUN S. Wildlife trade, consumption and conservation awareness in southwest China[J]. *Biodiversity and Conservation*, 2008, 17(6): 1493-1516.
- [44] 高陞, 马建章, 王慷林. 滇西边境地区涉案野生动物资源调查研究[J]. *野生动物学报*, 2012, 33(3): 158-162.
GAO S, MA J Z, WANG K L. Study of crime related to protected wildlife in border areas of western Yunnan[J]. *Chinese Journal of Wildlife*, 2012, 33(3): 158-162.
- [45] LI Y M, LI D M. The dynamics of trade in live wildlife across the Guangxi border between China and Vietnam during 1993—1996 and its control strategies[J]. *Biodiversity and Conservation*, 1998, 7(7): 895-914.
- [46] 周昭敏, 赵宏, 张忠旭, 等. 中国穿山甲与爪哇穿山甲甲片异速生长分析及其在司法鉴定中的应用[J]. *动物学研究*, 2012, 33(3): 271-275.
ZHOU Z M, ZHAO H, ZHANG Z X, et al. Allometry of scales in Chinese pangolins (*Manis pentadactyla*) and Malayan pangolins (*Manis javanica*) and application in judicial expertise. *Zoological Research*, 2012, 33(3): 271-275.
- [47] MOHAPATRA R K, SPANDA S, NAIR M V, et al. A note on the illegal trade and use of pangolin body parts in India[J]. *International Social Science Review*, 2015, 27(34): 156-158.
- [48] 刘振河, 徐尤辉. 穿山甲的生活习性及其资源保护问题[J].

- 动物学杂志, 1981(1):42-43.
- LIU Z H, XU Y H. The habits and resources conservation of pangolin[J]. Chinese journal of Zoology, 1981(1):42-43.
- [49] 遇达伟, 郝二虎, 林英华, 等. 中国穿山甲的现状与保护对策[J]. 东北林业大学学报, 2001, 29(2):79-82.
- YU D W, GAO E H, LIN Y H, et al. The status and countermeasures for Protection of Chinese Pangolin[J]. Journal of Northeast Forestry University, 2001, 29(2):79-82.
- [50] 王培伦. 穿山甲生活习性及其资源保护[J]. 环保科技, 1989 (4):27-28.
- WANG P L. The living habits and conservation of pangolin[J]. Environment Protection and Technology, 1989 (4):27-28.
- [51] 吴诗宝, 刘迺发, 张迎梅, 等. 中国穿山甲受危状况评估[J]. 应用与环境生物学报, 2004, 10(4):456-461.
- WU S B, LIU N F, ZHANG Y M, et al. Assessment of threatened status of Chinese pangolin (*Mains pentadactyla*)[J]. Chinese Journal of Applied and environmental Biology.
- [52] PANTEL S, ANAK N A. A preliminary assessment of Sunda pangolin trade in Sabah[R]. Petaling Java, Malaysia: TRAFFIC Southeast Asia, 2010.
- [53] NIJMAN V, ZHANG M X, SHEPHERD C R. Pangolin trade in the Mong La wildlife market and the role of Myanmar in the Smuggling of pangolins into China[J]. Global Ecology and Conservation, 2016, 5:118-126.
- [54] YANG C W, CHEN S M, CHANG C Y, et al. History and dietary husbandry of pangolins in Captivity[J]. Zoo Biology, 2007, 26(3):223-230.
- [55] van EE C A. A note on breeding the Cape pangolin *Manis temmincki* at Bloemfontein Zoo[J]. International Zoo Yearbook, 1966, 6(1):163-164.
- [56] MASUI M. Birth of a Chinese pangolin *Manis pentadactyla* at Ueno Zoo, Tokyo[J]. International Zoo Yearbook, 1967, 7(1):114-116.
- [57] YU J Y, JANG F L, PENG J J, et al. The First birth and survival of cub in captivity of critically endangered malayan pangolin (*Marris javanica*) [J]. Agricultural Science & Technology, 2015, 16(10):2323-2330.

Animal Sciences

An Overview of Wild Pangolins Status and the Related Illicit Trade in China

GUO Shanshan, PENG Jianjun, LIU Shuang, LIU Ping

(College of life science, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract: [Purposes] To provide relevant information for protecting the existing wild population and suppressing the illegal trade of pangolins (*Manis* sp.). [Methods] The status and distribution of wild pangolins in China were analyzed through searching the relevant literature. The key word “pangolin”, “seizure”, “smuggling trade” were used to search the websites, CNKI and other databases on the illegal trade of pangolins in China from 1999 to 2017 through Baidu search engine. Depending on the search query, number of seizures and cities involved were collected, and the illegal trade situation and trade routes in China were also analyzed and summarized from 1999 to 2017. [Findings] The population and distribution range have drastically declined in China. Among the 394 cases concerning the illegal trade of pangolins, a total of 3 585 live pangolins, 22 925 dead pangolins and 35 072.71 kg scales were seized. 23 provinces of China were involved in cases and Yunnan, Guangdong, Guangxi round out the top three in seizure incident numbers, the number of reported cases accounted for 26.14%, 25.13% and 17.26% of the total number of reported cases respectively. In addition, the illicit trade had 2 main routes; one (transportation by road) was from Myanmar or Vietnam to Guangxi and Yunnan, finally to other areas in China. the other (transportation by sea) was from Hongkong or Malaysia to Guangdong, finally to other areas in China. [Conclusions] To effectively inhibiting the sharp decline of pangolins and restore the wild populations, the following advices were offered that: 1) speeding up the process of pangolins artificial breeding, strengthen the research on population diffusion under artificial assistance and reintroduce pangolins into extinct areas. 2) restoring habitats of the wild pangolins; 3) increasing supervision and administration of the illegal trade in border areas (Yunnan and Guangxi) and coastal areas (Guangzhou), and working closer with other countries in the common fight against the illegal trade of pangolins; 4) studying the active composition and seek substituted material; 5) strengthening the related laws and regulations, propagandize the ecological value of pangolins in preventing termite damage and maintaining ecological balance.

Keywords: pangolin; population status; illicit trade

(责任编辑 方 兴)

鲫葡萄糖调节蛋白78基因部分序列的克隆、鉴定及功能预测*

刘小花, 赵元茗, 鄢彦杰, 张金叶

(重庆师范大学 生命科学学院 动物生物学重庆市重点实验室, 重庆 401331)

摘要:【目的】分析和预测鲫(*Carassius auratus*)葡萄糖调节蛋白78(Glucose regulated protein 78, GRP78)的功能,为研究GRP78在鱼类受细胞外刺激过程中的作用机制奠定基础。【方法】通过分子克隆技术获得鲫GRP78基因的部分序列,并利用生物信息学方法分析了该基因片段编码的蛋白质序列的二级结构、亲水性、可塑性、表面可及性和抗原表位。【结果】获得了长度为617 bp的鲫GRP78基因片段序列,共编码113个氨基酸。这些氨基酸所构成序列的相对分子质量约为1.3 kDa,等电点为5.82,无信号肽;可塑性区域位于第7~10位、第18~21位、第28~42位、第51~62位、第68~78位和第94~109位氨基酸残基;表面可及性区域位于第29~30位、第38~43位、第50~65位、第68~79位、第82~86位、第97~99位、第102~104位和第106~111位氨基酸残基;有1个B细胞抗原表位区域,位于第28~45位氨基酸残基。【结论】所获的鲫GRP78序列中含有ATPase保守结构域区段,该区段定位于内质网,具有较强亲水性。

关键词: 鲫; GRP78 基因; 生物信息学分析

中图分类号: Q958.9

文献标志码: A

文章编号: 1672-6693(2019)02-0018-06

葡萄糖调节蛋白78(Glucose regulated protein 78, GRP78)又称免疫球蛋白重链结合蛋白(Immunoglobulin heavy chain binding protein, Bip),隶属HSP70家族,于20世纪70年代后期与GRP94和GRP58作为葡萄糖饥饿诱导的细胞蛋白质被同时发现^[1]。GRP78含有位于肽链N端的ATP酶结构域(ATP binding domain)和C端的肽结合结构域(Peptide substrate binding domain)。由于GRP78在蛋白质折叠,装配和运输中的多种功能,因此,它是内质网(Endoplasmic reticulum, ER)的重要分子伴侣,并被认为是内质网应激(Endoplasmic reticulum stress, ERS)的标志蛋白^[2]。GRP78对于降解不稳定和错误折叠的蛋白质以及调节内质网跨膜信号传感器的活性也必不可少^[3]。GRP78基因不仅在细胞内表达,而且偶尔在细胞表面表达^[4-6]。研究表明:GRP78在细胞毒性、细胞凋亡、衰老过程和年龄相关疾病中也具有自身独特的功能^[7-8];同时该蛋白还参与肿瘤的发生形成并起着重要的作用^[9-10];另外该蛋白还可以与重金属形成复合物,表明它在防止重金属毒性方面也有潜在的作用^[11]。

作为一类变温动物,鱼类对细胞外刺激如水温、重金属、氧、渗透压、疾病等更为敏感。这些刺激会影响鱼的分布和身体状况,因此,对于鱼类应激蛋白的研究非常重要^[12]。目前已有一些鱼类如虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*, GenBank 登录号: AB196459)、牙鲮(*Paralichthys olivaceus*, GenBank 登录号: DQ662232)和草鱼(*Ctenopharyngodon idella*, GenBank 登录号: FJ436356)的GRP78基因被人们研究^[13-14],结果发现这些鱼类在热休克、冷胁迫或重金属离子(如Pb²⁺, Hg²⁺和Cd²⁺)胁迫下,GRP78含量和GRP78基因的mRNA表达增加。此外,有研究者基于嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)感染南亚野鲮(*Labeo rohita*)过程对热休克蛋白基因(7种HSP基因)表达进行分析,发现该鱼肝脏中GRP78基因的表达高于其他组织^[15]。以上结果表明,GRP78不仅有助于保护细胞免受热或冷极端的影响,而且在一定程度上保护细胞免受重金属刺激,并表明它在免疫调节过程中有重要的作用^[16-18]。相比之下,作为中国重要经济鱼类的鲫(*Carassius auratus*)GRP78基因相关研究还未见报道。为此,本研究对鲫GRP78基因的部分序列进行了克隆、鉴定及功能预测,旨在为进一步研

* 收稿日期:2018-07-09 修回日期:2019-02-12 网络出版时间:2019-03-15 07:00

资助项目:国家自然科学基金(No. 31672280; No. 31471980; No. 31601845);重庆市基础与前沿研究项目(No. cstc2014jcyjA00006);重庆市教育委员会科学技术研究项目(No. KJ1400515)

第一作者简介:刘小花,女,研究方向为鱼类寄生虫学, E-mail: 1367889115@qq.com;通信作者:张金叶,女,副教授,博士, E-mail: yjz0916@163.com

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20190315.0057.022.html>

究该基因在鲫遭遇粘孢子虫(*Myxosporea*)感染后所发挥的功能提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

用于实验的成年鲫采自重庆市沙坪坝区虎溪镇养殖场。DNA 提取试剂盒 DNeasy Blood & Tissue Kit、胶回收试剂盒 Gel Extraction Kit 和质粒提取试剂盒 E. Z. N. A Plasmid Mini Kit I 购自 QIAGEN 公司;pMD19-T、rTaq 聚合酶、dNTPs 和 DL5000 Marker 购自 Takara 公司。

1.2 基因组 DNA 的提取

鲫基因组 DNA 的提取采用 DNeasy Blood & Tissue Kit 试剂盒,严格遵守试剂盒操作手册,并进行电泳检测和浓度测定;提取到的 DNA 于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3 GRP78 基因片段的克隆和测序

以提取到的鲫 DNA 做为模板来扩增 GRP78 基因片段。用于扩增的引物有:Myxohsp1f($5'$ -ACTGCT-GCCGCCATGCT- $3'$)和 Myxohsp1r($5'$ -ATACGAGTGGATCCACC- $3'$),Kth70A1f($5'$ -GGTTTTGACAAGAAAGAT-GG- $3'$)和 Kth70A1r($5'$ -CAATTTGCTATCGTCGAG- $3'$)^[19]。PCR 反应体系包括:10×PCR Buffer 5 μL , 3 mmol·L⁻¹的 MgCl₂ 4 μL ,0.2 mmol·L⁻¹的 dNTPs 4 μL ,上述引物各 1.5 μL ,模板 DNA 3 μL ,2.5 U 的 rTaq 酶 0.2 μL ,最后灭菌双蒸水补足至 50 μL 。反应程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,54 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s 过程循环 30 次;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。将 3 μL PCR 产物进行电泳检测,纯化采用 Gel Extraction Kit 试剂盒,纯化后的 PCR 产物插入 pMD19-T 载体,菌液送上海英潍捷基贸易有限公司进行测序。

1.4 生物信息学分析

利用 BioEdit 软件将获得的鲫 GRP78 基因片段序列进行拼接并翻译成氨基酸序列。利用在线软件(<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>)预测该片段的内含子。利用 GenBank 选取黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*, GenBank 登录号:KM114873)、斑马鱼(*Danio rerio*, GenBank 登录号:Q6P3L3)和人(*Homo sapiens*, GenBank 登录号:M19645)的 GRP78 氨基酸序列,随后利用 Clustalx 1.83 对上述物种的氨基酸序列进行多重比对。参照从 GenBank 选取的 3 个物种的 ATP 酶结构域^[17],从而得到鲫 GRP78 氨基酸序列的 ATP 酶结构域。利用 DNA-Star 软件中的 Protean 程序对 GRP78 的二级结构和抗原表位进行分析和预测。GRP78 的理化性质预测、蛋白亲/疏水性和信号肽分析所用软件和方法参照文献[20];该蛋白的亚细胞定位分析所用软件和方法参照文献[21]。

2 结果

2.1 GRP78 基因片的特征分析

本研究获得的鲫 GRP78 基因片段长 617 bp,目前该序列已提交到 GenBank,登录号为 MH559338。BioEdit 分析表明该序列中 AT 碱基比为 48.95%,GC 碱基比为 51.05%。通过在线软件(<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>)对其中的内含子和外显子进行分析,发现该序列含有 1 个外显子和 2 个内含子,符合 GT-AG 规则;外显子长 341 bp,编码 113 个氨基酸(图 1)。

NCBI 比对显示,该氨基酸序列与布氏新亮丽鲷(*Neolamprologus brichardi*, GenBank 登录号:XP006789210)、南亚野鲮(GenBank 登录号:AIH80324)和安水金线鲃(*Sinocyclocheilus anshuiensis*, GenBank 登录号:XP016338832)的 GRP78 最为相似,相似度分别为 98%,99%和 99%,证实本研究克隆所得的 DNA 片段确为鲫 GRP78 基因片段。与黄颡鱼、斑马鱼和人的 GRP78 氨基酸序列进行多重对比后可知,鲫 GRP78 序列具有 ATPase 结构域,但缺少 C 端的肽结合结构域(图 2)。

鲫 GRP78 的相对分子质量约为 1.3 kDa,等电点为 5.82;该蛋白由 17 种氨基酸组成,其中 Glu 比例最高占 10.6%,Tyr 比例最低均占 0.9%(表 1),带负电荷的残基(Asp 和 Glu)总个数为 21,带正电的残基(Arg 和 Lys)总个数

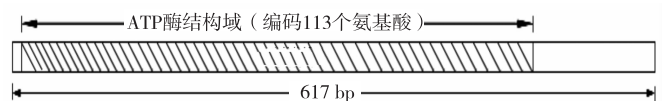


图 1 鲫 GRP78 蛋白片段序列结构示意图

Fig. 1 The schematic diagram of GRP78 fragment in *C. auratus*

为 18; GRP78 的不稳定指数 (II) 为 34.02。

ExPaSy 和 Bioedit 分析结果显示, 鲫 GRP78 具有典型的亲水区, 总平均亲水性为 -0.521, 表明该蛋白为亲水性蛋白 (图 3)。SignalP 分析结果显示, GRP78 的 C, Y 和 S 值分别为 0.146, 0.137 和 0.170, 三者平均值为 0.134, 表明该蛋白不存在信号肽 (封二彩图 4)。ProtComp 亚细胞定位预测结果显示, 鲫 GRP78 定位在内质网。

2.2 GRP78 二级结构预测结果

通过 DNASTar 软件中 Protean 模块的 Chou-Fasman 法和 Gamier-Robson 法^[22-23]对鲫 GRP78 二级结构进行分析。结果显示, 鲫 GRP78 的 α -螺旋结构较多, 主要位于第 42~55 位和第 60~113 位氨基酸残基; β -折叠位于第 1~5 位和第 12~15 位氨基酸残基; 转角位于第 7~8 位、第 18~21 位、第 29~41 位和第 56~59 位氨基酸残基; 不规则卷曲位于第 9~11 位、第 20~21 位和第 31~36 位氨基酸残基 (封二彩图 5)。

表 1 鲫 GRP78 的氨基酸组成

Tab. 1 Composition of amina acids of GRP78 in *C. auratus*

氨基酸	个数	比例	氨基酸	个数	比例	氨基酸	个数	比例
Ala(A)	7	6.2%	Gly(G)	9	8.0%	Phe(F)	9	8.0%
Arg(R)	8	7.1%	His(H)	4	3.5%	Ser(S)	4	3.5%
Asn(N)	3	2.7%	Ile(I)	5	4.4%	Thr(T)	7	6.2%
Asp(D)	9	8.0%	Leu(L)	10	8.8%	Tyr(Y)	1	0.9%
Gln(Q)	4	3.5%	Lys(K)	10	8.8%	Val(V)	9	8.0%
Glu(E)	12	10.6%	Met(M)	2	1.8%			

2.3 GRP78 亲水性、可塑性、表面可及性及抗原性预测结果

利用 Kyte-Doolittle 方法^[24]分析鲫 GRP78 的亲水性, 结果显示鲫 GRP78 存在亲水性区域, 这些区域主要位于第 28~45 位、第 48~89 位和第 93~113 位氨基酸残基 (图 6)。利用 Karplus-Schulz 方法^[25]分析鲫 GRP78 的可塑性, 结果显示其中含有较多的柔韧性区域, 主要位于第 7~10 位、第 18~21 位、第 28~42 位、第 51~62 位、第 68~78 位和 94~109 位氨基酸残基。采用 Jameson-wolf 方法^[26]对鲫 GRP78 进行分析, 结果显示其中含有的抗原性区域主要位于第 6~10 位、第 18~22 位、第 29~44 位、第 50~81 位、第 84~90 位和第 94~113 位氨基酸残基 (封二彩图 5)。采用 Plot Emini 方法^[27]对鲫 GRP78 进行分析, 发现其中呈现在表面可能性较大的区域主要是第 29~30 位、第 38~43 位、第 50~65 位、第 68~79 位、第 82~86 位、第 97~99 位、第 102~104 位和第 106~111 位氨基酸残基。

2.4 GRP78B 细胞抗原表位的预测分析

综合鲫 GRP78 的二级结构的转角区和无规则卷曲区、蛋白质亲水性、可塑性、抗原性及表面可及性的分析结果 (封二彩图 5, 图 6), 可以得出鲫 GRP78 的抗原表位主要位于 28~45 氨基酸残基, 此部分氨基酸序列为

```

C. auratus 1  ILVFDLGGGTFDVSLLTIDNGVFEVVAATNGDTHLGGEDFDQRMVMEHF IKLYKKTGK 57
P. fulvidraco 218 ILVFDLGGGTFDVSLLTIDNGVFEVVAATNGDTHLGGEDFDQRMVDHF IKLYKKTGK 274
D. rerio 218 ILVFDLGGGTFDVSLLTIDNGVFEVVAATNGDTHLGGEDFDQRMVMEHF IKLYKKTGK 274
H. sapiens 220 ILVFDLGGGTFDVSLLTIDNGVFEVVAATNGDTHLGGEDFDQRMVMEHF IKLYKKTGK 276
-----
C. auratus 58  DVRKDHRAVQKLRREVEKAKRALSAHQHARIEIESFFEGEDFSETLTRAKFEELNM 113
P. fulvidraco 275 DVRKDSRAVQKLRREVEKAKRALSSQHARIEIESFFEGEDFSETLTRAKFEELNM 330
D. rerio 275 DVRKDNRAVQKLRREVEKAKRALSAHQHARIEIESFFEGEDFSETLTRAKFEELNM 330
H. sapiens 277 DVRKDNRAVQKLRREVEKAK-ALSSQHARIEIESFFEGEDFSETLTRAKFEELNM 331

```

注: 深灰色代表相同的氨基酸残基

图 2 鲫和其他物种的 GRP78 同源蛋白的 ATP 酶结构域

Fig. 2 ATPase domain of GRP78 from *C. auratus* and other species

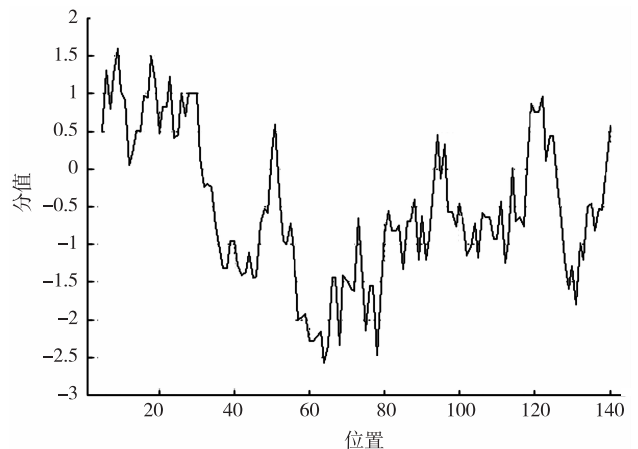


图 3 鲫 GRP78 序列的疏水性分析

Fig. 3 Hydrophobicity profile of GRP78 in *C. auratus*

“TNGDTHLGGEDFDQRVME”, 抗原指数为 16.2, 共有 1 个共同抗原表位。

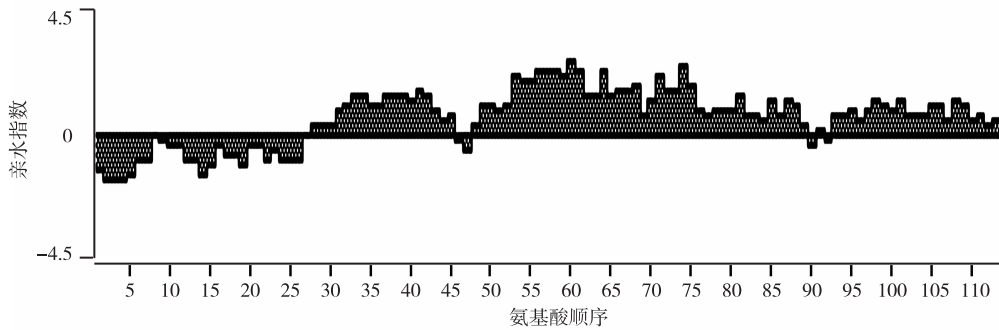


图 6 鲫 GRP78 的亲水性预测结果

Fig. 6 The prediction of the hydrophilicity of GRP78 in *C. auratus*

3 讨论

目前有关 GRP78 定位的研究较多,如胚胎期 GRP78 在小鼠(*Mus musculus*)脑组织的表达呈现从端脑到后脑逐渐降低的趋势^[28-29]。本研究结果显示鲫 GRP78 定位在内质网,但该蛋白在内质网的确切部位还需要进一步的深入研究。HSP70 蛋白是热休克蛋白家族中最保守的一类蛋白,可特异性地结合 ATP 并具有 ATP 酶活性。有研究表明,HSC71 ATP 酶参与蛋白质的体外释放^[30]。GRP78 作为 HSP70 家族成员之一,它具有的 ATP 酶结构域可以通过与 Bip 结合进而将蛋白质释放到体外^[17,30]。因此,可以推测鲫 GRP78 的 ATP 酶结构域在蛋白质的释放过程中发挥着重要的作用。

最近有研究表明,GRP78 参与分泌型组织和细胞的免疫反应。如石斑鱼(*Epinephelus spp.*)的肾细胞被病毒感染后,GRP78 在与病毒衣壳蛋白相互作用的过程中,GRP78 基因表达上调^[31];在副乳房链球菌(*Streptococcus parauberis*)感染牙鲆期间,GRP78 基因表达上调,表明该蛋白是关键 HSP^[32];GRP78 还参与细菌对家蚕(*Bombyx mori*)感染的免疫反应^[33];GRP78 可被日本血吸虫(*Schistosoma japonicum*)感染的小鼠的血清所识别,提示日本血吸虫 GRP78 具有高度的抗原特异性^[34]。在本研究中,获得的鲫 GRP78 基因的部分序列所编码的氨基酸序列中虽然含有较少的转角区和无规则卷曲区,形成的 B 细胞抗原表位较少,但可为后期研究鲫遭遇寄生虫感染的免疫反应奠定基础。

参考文献:

- [1] LEE A S. The glucose-regulated proteins; stress induction and clinical applications[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2001,26(8):504-510.
- [2] JI C, KAPLOWITZ N, LAU M Y, et al. Liver-specific loss of glucose-regulated protein 78 perturbs the unfolded protein response and exacerbates a spectrum of liver diseases in mice[J]. Hepatology, 2011,54(1):229-239.
- [3] HENDERSHOT L M. The ER function BiP is a master regulator of ER function[J]. Mount Sinai Journal of Medicine, 2004,71(5):289-297.
- [4] QUINONES Q J, de RIDDER G G, PIZZO S V. GRP78: a chaperone with diverse roles beyond the endoplasmic reticulum[J]. Histology & Histopathology, 2008, 23(11):1409-1416.
- [5] DAISUKE M, KAZUHIRO N. ER stress proteins in autoimmune and inflammatory diseases[EB/OL]. (2012-03-15) [2018-07-09]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3342303/>.
- [6] ZHANG Y, LIU R, NI M, et al. Cell surface relocalization of the endoplasmic reticulum chaperone and unfolded protein response regulator GRP78/BiP[J]. Journal of Biological Chemistry, 2010,285(20):15065-15075.
- [7] YU Z, LUO H, FU W, et al. The endoplasmic reticulum stress-responsive protein GRP78 protects neurons against excitotoxicity and apoptosis; suppression of oxidative stress and stabilization of calcium homeostasis[J]. Experimental Neurology, 1999,155(2):302-314.
- [8] PFAFFENBACH K T, LEE A S. The critical role of GRP78 in physiologic and pathologic stress[J]. Current Opinion in Cell Biology, 2011,23(2):150-156.
- [9] DEY A, KESSOVA I G, CEDERBAUM A I. Decreased protein and mRNA expression of ER stress proteins GRP78 and GRP94 in HepG2 cells over-expressing CYP2E1[J]. Archives of Biochemistry Biophysics, 2006, 447(2):155-166.
- [10] WU C T, WANG W C, CHEN M F, et al. Glucose-regula-

- ted protein 78 mediates hormone-independent prostate cancer progression and metastasis through maspin and COX-2 expression[J]. *Tumor Biology*, 2014, 35(1): 195-204.
- [11] GONICK H C. Lead-binding proteins: a review[J]. *Journal of Toxicology*, 2011, 2011(2011): 686050.
- [12] ZHU Y, FAN Q, MAO H, et al. GRP78 from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) provides cytoplasm protection against thermal and Pb²⁺ stress[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 34(2): 617-622.
- [13] OJIMA N, YAMASHITA M, WATABE S. Quantitative mRNA expression profiling of heat-shock protein families in rainbow trout cells[J]. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 2005, 329(1): 51-57.
- [14] 吴初新, 刘毅, 马梅生, 等. 热休克、Poly I: C 上调草鱼 GRP78 基因表达[J]. *应用与环境生物学报*, 2009, 15(6): 814-818.
WU C X, LIU Y, MA M S, et al. Up-regulation of grass carp GRP78 gene expression under heat shock and poly I: C stress[J]. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2009, 15(6): 814-818.
- [15] DAS S, MOHAPATRA A, SAHOO P K. Expression analysis of heat shock protein genes during *Aeromonas hydrophila* infection in rohu, *Labeo rohita*, with special reference to molecular characterization of Grp78 [J]. *Cell Stress and Chaperones*, 2015, 20(1): 73-84.
- [16] ZHONG B, WANG X, MAO H, et al. A mechanism underlies fish GRP78 protection against Pb²⁺ toxicity[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 66: 185-188.
- [17] ZHONG B, MAO H, FAN Q, et al. SiRNA-mediated knockdown of *CiGRP78* gene expression leads cell susceptibility to heavy metal cytotoxicity[J]. *Gene*, 2014, 552(2): 219-224.
- [18] SONG Y F, LUO Z, HUANG C, et al. Endoplasmic reticulum stress-related genes in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*: molecular characterization, tissue expression, and expression responses to dietary copper deficiency and excess[J]. *G3 Genesgenetics*, 2015, 5(10): 2091-2104.
- [19] WHIPPS C M, KENT M L. Phylogeography of the cosmopolitan marine parasite *Kudoa thyrssites* (Myxozoa: Myxosporia) [J]. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2006, 53(5): 364-373.
- [20] 刘晓聪, 赵元君, 张金叶. 瓶囊碘泡虫 HSP70 基因的克隆、鉴定及功能预测[J]. *重庆师范大学学报(自然科学版)*, 2016, 33(2): 37-42.
LIU X C, ZHAO Y J, ZHANG J Y. Cloning, identification and functional prediction of heat shock protein 70 gene in *Myxobolus am pullicapsulatus* [J]. *Journal of Chongqing Normal University (Natural Science)*, 2016, 33(2): 37-42.
- [21] 陈四妙, 陈晓峰, 杨成东等. 稻瘟病菌分泌复合物的生物信息学分析及 MoSec15 定位研究[J]. *福建农林大学学报(自然科学版)*, 2014, 43(3): 282-288.
CHEN S M, CHEN X F, YANG C D, et al. Bioinformatics analysis of exocyst complex and the subcellular localization of MoSec15 in *Magnaporthe oryzae* [J]. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)*, 2014, 43(3): 282-288.
- [22] GARNIER J, OSGUTHORPE D J, ROBSON B. Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1978, 120(1): 97-120.
- [23] CHOU P Y, FASMAN G D. Prediction of the secondary structure of protein conformation[M]. New York: Plenum Press, 1990: 549-586.
- [24] KYTE J, DOOLITTLE R F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1982, 157(1): 105-132.
- [25] KARPLUS P A, SCHULZ G E. Prediction of chain flexibility in proteins [J]. *Naturwissenschaften*, 1985, 72(4): 212-213.
- [26] JAMESON B A, WOLF H. The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants[J]. *Computer Applications in the Biosciences Cabios*, 1988, 4(1): 181.
- [27] EMINI E A, HUGHES J V, PERLOW D S, et al. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide[J]. *Journal of Virology*, 1985, 55(3): 836-839.
- [28] Reddy R K, Mao C, Baumeister P, et al. Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors: role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(23): 20915-20924.
- [29] 李波, 陈誉华. 内质网分子伴侣 GRP78 在小鼠脑发育过程中的时空表达[J]. *实验生物学报*, 2003, 36(2): 137-144.
LI B, CHEN Y H. The expression of glucose-regulated protein 78 (GRP78) in mouse brain during early development [J]. *Acta Biologica Experimentalis Sinica*, 2003, 36(2): 137-144.
- [30] GAUT J R, HENDERSHOT L M. Mutations within the nucleotide binding site of immunoglobulin-binding protein inhibit ATPase activity and interfere with release of immunoglobulin heavy chain[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268(10): 7248-7255.
- [31] LU M W, NGOU F H, CHAO Y M, et al. Transcriptome characterization and gene expression of *Epinephelus* spp in endoplasmic reticulum stress-related pathway during

- betanodavirus infection *in vitro* [J]. *Bmc Genomics*, 2012, 13(1):651-651.
- [32] CHA I S, KWON J, PARK S B, et al. Heat shock protein profiles on the protein and gene expression levels in olive flounder kidney infected with *Streptococcus parauberis* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 34(6):1455-1462.
- [33] XI X Z, MA K S. Molecular cloning and expression analysis of glucose-regulated protein 78 (GRP78) gene in silkworm *Bombyx mori* [J]. *Biologia*, 2013, 68(3):559-564.
- [34] 高珏, 余传信, 宋丽君, 等. 日本血吸虫热休克蛋白 70 (Sj HSP70) 的抗体反应特征及免疫诊断价值 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2014, 9(8):699-705.
- GAO W, YU C X, SONG L J, et al. Characterization of the antibody response to heat shock protein 70 (Sj HSP70) of *Schistosoma japonicum* and the immunological diagnostic value of that protein [J]. *Journal of Pathogen Biology*, 2014, 9(8):699-705.

Animal Sciences

Cloning, Identification, and Functional Prediction of Partial Gene Sequence of Glucose Regulated Protein 78 in *Carassius auratus*

LIU Xiaohua, ZHAO Yuanjun, YAN Yanjie, ZHANG Jinye

(Chongqing Key Laboratory of Animal Biology, College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract: [Purposes] To analyze and predict the function of glucose regulated protein 78 (GRP78) in *Carassius auratus* and provide a foundation for studying the mechanism of GRP78 during the process of extracellular stress in fish. [Methods] A partial sequence of GRP78 gene in *C. auratus* was cloned, whose physicochemical property including secondary structures, hydrophilicity, flexibility, surface probability, antigen epitope, was analyzed by bioinformatics methods. [Findings] The GRP78 gene fragment sequence with long 617 bp was obtained. The sequence encodes a total of 113 amino acids with molecular weight about 1.3 kDa and pI 5.82. None signal peptide was existed. The flexibility was located at 7th~10th, 18th~21st, 28th~42nd, 51st~62nd, 68th~78th, and 94th~109th amino acid residues; the surface probability was placed at 29th~30th, 38th~43rd, 50th~65th, 68th~79th, 82nd~86th, 97th~99th, 102nd~104th, and 106th~111th amino acid residues. Additionally, one B cell epitope was predicted as 28th~45th amino acids residues. [Conclusions] ATPase domain was obtained in the *C. auratus* GRP78 gene fragment with higher hydrophilicity, which is located in ER.

Keywords: *Carassius auratus*; GRP78; bioinformatic analysis

(责任编辑 方 兴)

低剂量镉暴露对雄性斑马鱼生殖内分泌的干扰*

安晶晶, 谢冬梅, 李英文, 陈启亮

(重庆师范大学 生命科学学院 重庆市高校动物生物学重点实验室, 重庆 401331)

摘要:【目的】评估低剂量镉(Cd)暴露对成年雄性斑马鱼(*Danio rerio*)生殖内分泌的影响。【方法】将成年雄性斑马鱼暴露于质量浓度为 $5\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 镉离子(Cd^{2+})30 d后,分析精巢组织学结构、血浆11-酮基睾酮(11-KT)质量浓度、下丘脑-垂体-性腺(HPG)轴以及减数分裂关键基因转录水平的变化。【结果】与对照组相比,Cd暴露组精巢组织出现早期生殖细胞增多、精子数量减少和空隙等变化;血浆11-KT质量浓度与对照组相比有统计学意义上的增加($p<0.05$);此外,Cd暴露上调了视黄酸合成酶基因 *aldh1a2* 和 HPG 轴关键基因 *gnrh2*, *fsh β* , *lh β* , *fshr*, *lhr*, *ar* 的表达水平,下调了联会复合体蛋白3基因 *syncp3* 的表达水平,这些差异具有统计学意义($p<0.05$),而 HPG 轴关键基因 *gnrh3*、DNA 减数分裂重组酶1基因 *dmcl* 和视黄酸降解酶基因 *cyp26b1* 的表达水平与对照组相比没有统计学意义上的差异。【结论】低剂量 Cd 暴露通过调节 HPG 轴和减数分裂关键基因的表达水平干扰成年雄性斑马鱼生殖内分泌。

关键词: 斑马鱼; 低剂量镉暴露; HPG 轴; 减数分裂; 生殖内分泌

中图分类号: Q175

文献标志码: A

文章编号: 1672-6693(2019)02-0024-06

镉(Cd)是一种非必需有毒重金属,对人体健康有严重危害^[1]。近些年来工业的快速发展导致水环境中 Cd 污染越来越严重,对水生生态系统构成威胁^[2]。鱼类是水生生态系统的重要组成部分,它们的内分泌系统与其他脊椎动物相似,因而被作为检测环境危害的指示生物^[3]。由于 Cd 具有生物难降解性,暴露在 Cd 污染水体中的鱼类的组织或器官容易富集 Cd,进而导致体内的生物学反应受到干扰^[4-5],甚至导致生殖发育受到影响^[6-8]。减数分裂是有性生殖的基础和物种保持稳定性的前提,具有重要的生物学意义;而鱼类的性腺发育和配子形成受到下丘脑-垂体-性腺(HPG)轴的调节^[9]。已有研究表明,Cd 暴露可损害鱼类生殖腺并影响配子发生^[6,10-11]。中国渔业水质标准对水体中 Cd 的质量浓度限值为 $5\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,因此目前许多研究主要关注高于这一限值的 Cd 暴露诱导的鱼体损伤,而关于 $5\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 暴露对鱼体生殖内分泌的影响研究较少。

斑马鱼(*Danio rerio*)具有繁殖周期短、体外受精、胚胎透明等优点^[12],是毒性研究的理想模式动物^[3]。在本研究中,将成年雄性斑马鱼分别暴露在含0(对照)和 $5\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 镉离子(Cd^{2+})的水体中30 d,随后观察精巢组织学结构,检测血浆11-酮基睾酮(11-KT)质量浓度、HPG轴及减数分裂关键基因的表达水平,从而了解低剂量 Cd 暴露对鱼类生殖的潜在影响,为重金属对鱼类的风险评估提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

实验用成年雄性斑马鱼(AB系,120 d龄)购自国家斑马鱼资源中心;分析纯 CdCl_2 购自上海国药集团;11-KT酶联免疫吸附测定试剂盒购自 Cayman 公司;RNAiso plus 以及反转录试剂盒购自 TaKaRa 公司。

1.2 Cd 暴露处理

实验鱼在室内恒温(约 $28\ ^\circ\text{C}$)循环水养殖系统中暂养并适应14 d后,挑选120尾规格一致、体质量为 $(0.34\pm 0.03)\ \text{g}$ 的健康雄鱼,放入规格一致($50\ \text{cm}\times 20\ \text{cm}\times 30\ \text{cm}$)的6个缸中,每缸20尾,每缸盛水20 L。其

* 收稿日期:2018-09-26 修回日期:2018-11-21 网络出版时间:2019-03-15 07:00

资助项目:重庆市基础与前沿研究计划项目(No. cstc2015jcyjA80012);重庆师范大学校级基金项目(No. 15XLB012);重庆师范大学研究生科研创新项目(No. YKC17009)

第一作者简介:安晶晶,女,研究方向为水生毒理学,E-mail:annjingjing947@163.com;通信作者:陈启亮,男,副教授,博士,E-mail:xncql@126.com

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20190315.0056.002.html>

中 3 个缸的实验鱼为对照组,驯养水体中 Cd^{2+} 质量浓度为 0;其余 3 个缸的实验鱼为 Cd 暴露组,驯养水体中加入预先配好的 CdCl_2 母液,使 Cd^{2+} 质量浓度为 $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。处理时间为 30 d。实验期间,每日喂食 3 次商业饲料,并更换缸中 1/2 体积的水,同时 Cd 暴露组驯养水体中还补充相应的 CdCl_2 母液以保证 Cd^{2+} 质量浓度维持在 $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。实验期间两个组的水温、溶解氧质量浓度和 pH 分别为 $(28 \pm 0.5) \text{ }^\circ\text{C}$, $(6.84 \pm 0.45) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 7.70 ± 0.23 ,光照周期为 14 h 光照 : 10 h 黑暗。

1.3 指标测定

1.3.1 组织学分析 实验处理结束后取材,每缸随机取出 3 尾实验鱼,用 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MS-222 进行麻醉后,取出精巢组织置于波恩氏液中固定 24 h。固定材料经梯度乙醇溶液中脱水并包埋于石蜡中,经 $5 \mu\text{m}$ 矢状切片和苏木精-伊红(HE)染色,置于徕卡仪器有限公司生产的 UB203I 型光学显微镜下观察并拍照。

1.3.2 11-KT 质量浓度测定 每缸随机取 10 尾实验鱼,采用断尾法取血。将血液置于含有肝素钠的离心管中,并将 10 尾鱼的血浆样本合并为 1 个测定样品。将样品以 $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下离心 10 min,取上清液以 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存,之后用于 11-KT 质量浓度测定。11-KT 质量浓度测定方法严格按照 11-KT 酶联免疫吸附测定试剂盒说明书进行。

1.3.3 基因表达分析 每缸随机取 3 尾实验鱼,用 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MS-222 麻醉后,立即取出脑和精巢置于装有 1 mL RNAiso plus 试剂的离心管中,液氮速冻后保存于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 。参照 Chen 等人^[13]的方法,通过实时荧光定量 PCR (qPCR)检测基因的表达水平。样品总 RNA 提取按照 RNAiso plus 试剂盒说明书进行操作。用核酸检测仪检测总 RNA 的 $A_{260/280}$ 值为 $1.8 \sim 2.0$,并用质量分数为 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性。然后,取总 RNA 用 PrimeScript[®] RT 试剂盒 (TaKaRa) 进行逆转录合成 cDNA,并以此为模板使用 SYBR Premix Ex Taq[™] 试剂盒 (TaKaRa) 进行 qPCR 分析。qPCR 的反应条件为: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 30 s; 40 个循环的 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 5 s, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 30 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 30 s。相关引物由擎科生物公司合成,引物序列具体信息见表 1。以 *efl α* 作为内参,用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法进行定量结果分析^[14]。

1.4 数据分析

所有实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。使用 SPSS 17.0 软件,采用独立样本 *t* 检验检测 Cd 暴露组和对照组数据的差异;当 $p < 0.05$ 时,差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 精巢组织学结构

结果显示,在对照组斑马鱼的精巢中,可见生精小管内充满了早期生殖细

表 1 qPCR 引物

Tab. 1 Primers used for qPCR

基因	引物序列	Genbank 序列号
<i>gnrh2</i>	F: 5'-GGTCTCACGGCTGGTATCCT-3'	NM181439
	R: 5'-TGCCTCGCAGAGCTTCACT-3'	
<i>gnrh3</i>	F: 5'-TGGTCCAGTTGTTGCTGTTAGTT-3'	NM182887
	R: 5'-CCTGAATGTTGCCTCCATTTC-3'	
<i>fshβ</i>	F: 5'-TGAGCGCAGAATCAGAATG-3'	AY424303
	R: 5'-AGGCTGTGGTGTGCGATTGT-3'	
<i>lhβ</i>	F: 5'-GGACACGCAGAGACACTT-3'	AY424304
	R: 5'-CACCGATACCGTCTCATT-3'	
<i>ar</i>	F: 5'-GCGAATGGATGGATGTAAC-3'	EF153102
	R: 5'-TCATCAGAGCAGATTAGGC-3'	
<i>fshr</i>	F: 5'-ATGGATCCACTCGCTCTTT-3'	AY278107
	R: 5'-GCATTACTGGGAATCCTCTCTAT-3'	
<i>lhr</i>	F: 5'-AAGGACGAGTCGCTGAAAC-3'	AY714133
	R: 5'-GATTCATTGTGGCGTATTCA-3'	
<i>cyp11b2</i>	F: 5'-CTGGGCCACACATCGAGAG-3'	NM001080204
	R: 5'-AGCGAACGGCAGAAATCC-3'	
<i>aldh1a2</i>	F: 5'-TCCAGGAAGCCGACAAGG-3'	NM131850
	R: 5'-CCAGGGTAGCAAGGTAAGCA-3'	
<i>cyp26b1</i>	F: 5'-TGTCAGGAGGATACAGAATAGC-3'	NM212666
	R: 5'-AGCCGAGGTGTCATGGGT-3'	
<i>sycp3</i>	F: 5'-GCGTTTGTGGTTGGATT-3'	NM001040350
	R: 5'-CACCGTCAGTATGTTTGG-3'	
<i>dmcl</i>	F: 5'-GAGGCTGAAGGACATCG-3'	NM 001020782
	R: 5'-TCCAGCCGTAATGGCAA-3'	
<i>eflα</i>	F: 5'-GATCACTGGTACTTCTCAGGCTGA-3'	FJ915061
	R: 5'-GGTGAAAGCCAGGAGGGC-3'	

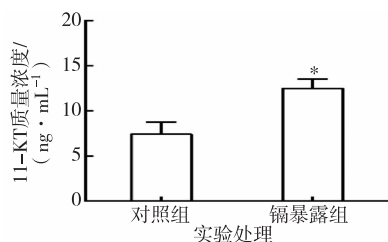
胞(精原细胞及精母细胞)和大量的精子(封二彩图 1a);而 Cd 暴露组可见早期生殖细胞增多、精子数量减少和空隙出现(封二彩图 1b)。

2.2 11-KT 质量浓度

Cd 暴露对斑马鱼血浆中 11-KT 质量浓度的影响如图 2 所示,可见 Cd 暴露组 11-KT 质量浓度比对照组更高,两者差异具有统计学意义($p < 0.05$)。

2.3 HPG 轴相关基因表达水平

如图 3a, b 所示,与对照组脑、精巢组织中的 HPG 轴相关基因表达水平相比, Cd 暴露组的 *gnrh2*, *fsh β* , *lh β* , *fshr*, *lhr*, *cyp11b2* 及 *ar* 基因表达水平均明显上调,且相关差异均具有统计学意义($p < 0.05$);而两个组的 *gnrh3* 基因表达水平无统计学意义上的差异。



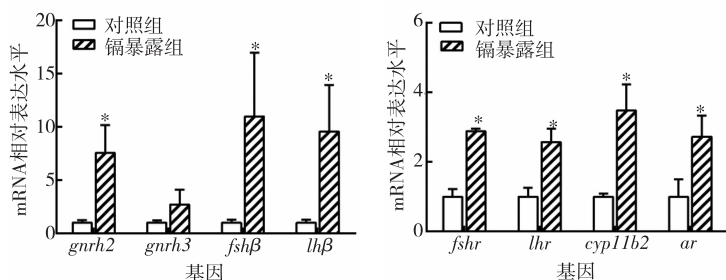
注: * 表示与对照组数据相比具有统计学

意义上的差异($p < 0.05$),下同

图 2 Cd 暴露对雄性斑马鱼血浆 11-KT 质量浓度的影响

Fig. 2 Effects of cadmium exposure on

plasma 11-KT mass concentration of male zebrafish



a 对脑组织 HPG 轴相关基因的影响

b 对精巢组织 HPG 轴相关基因的影响

图 3 Cd 暴露对雄性斑马鱼 HPG 轴相关基因表达水平的影响

Fig. 3 The effect of cadmium exposure on the expression level of

HPG axis related genes in male zebrafish

2.4 减数分裂相关基因表达水平

图 4 显示,与对照组的减数分裂相关基因表达水平相比, Cd 暴露组的 *aldh1a2* 基因表达水平明显上调, *sy-cp3* 基因表达水平明显下调,且与对照组的这两个基因的表达水平相比均具有统计学意义上的差异($p < 0.05$);此外,两个组的 *dmc1* 和 *cyp26b1* 基因表达水平均无统计学意义上的差异。

3 讨论

研究表明, Cd 暴露会损伤鱼类的精巢组织。例如,将食蚊鱼(*Gambusia affinis*)分别在 5, 20, 100 和 500 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Cd 暴露环境中处理 21, 35 和 56 d 后,精子数量明显减少^[15];剑尾鱼(*Xiphophorus hellerii*)在 Cd^{2+} 质量浓度分别为 100 和 500 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的水体中暴露 5 d,出现了生精小管退化、精子发生起始以及初级次级精母细胞聚集等现象^[16];此外, Kumari 等人^[17]对无须魮(*Puntius sarana*)进行质量浓度为 2 000 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Cd 暴露 30 d,发现精小叶出现组织损伤。本研究中,可以观察到质量浓度为 5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Cd 暴露处理使得斑马鱼精子数量减少而早期生殖细胞增多,这表明低剂量 Cd 暴露可能阻碍成年雄性斑马鱼的精子发生。另外,与对照组相比 Cd 暴露组中斑马鱼精巢组织出现许多空隙,这可能是由于精子数量减少所致。

HPG 轴是鱼类重要的神经内分泌系统,参与调节一系列生殖活动,促进和控制生殖细胞的起源、性别分化、性腺的发育和成熟^[18-19]。和其他脊椎动物一样,硬骨鱼类的精子发生受性激素的调节^[20],垂体促性腺激素刺激间质细胞产生雄激素,并最终控制精子发生和精子形成^[21-24]。在本研究中,与对照组相比, Cd 暴露组的 *gnrh2*, *fsh β* , *lh β* , *fshr* 和 *lhr* 基因的表达水平明显上调。因此, Cd 暴露可能促使斑马鱼体上调 *gnrh2* 基因表达,促进促性腺激素释放激素(GnRH)的合成和分泌,进而提高 *fsh β* 及 *lh β* 基因的转录水平,促进卵泡刺激素(FSH)及促黄

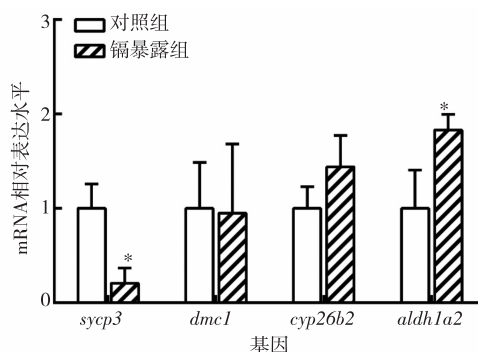


图 4 镉暴露对斑马鱼精巢减数分裂相关基因表达水平的影响

Fig. 4 The effect of cadmium exposure on the expression level of meiosis related genes in the testis of zebrafish

体生成素(LH)的合成和分泌,从而上调 *fshr* 及 *lhr* 基因的表达,最终促进性激素的合成。11-KT 是雄性硬骨鱼最主要的性激素^[25],本研究结果显示,与对照组相比,Cd 暴露组实验鱼血浆 11-KT 质量浓度明显上升,这与 Sellin 等人^[26]将雄性黑头呆鱼(*Pimephales promelas*)暴露于质量浓度为 $12.5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Cd^{2+} 中 21 d 后发现血浆 11-KT 质量浓度上升的结果相一致。类固醇合成酶基因 *cyp11b2* 在睾酮(T)转化为 11-KT 的过程中起着关键的调节作用。本研究中,与对照组相比,Cd 暴露导致实验鱼 *cyp11b2* 基因表达水平上调,可能促进了 T 向 11-KT 转化,从而最终导致实验鱼血浆中 11-KT 质量浓度上升,进而导致性激素受体基因 *ar* 表达水平升高。

雄鱼体内的 11-KT 在精子形成后期起着至关重要的作用^[27-28],血浆中 11-KT 质量浓度的上升可能会促进精子的成熟而引起精子数量增多。然而,这与本研究中组织学结构观察发现 Cd 暴露导致斑马鱼精巢中精子数量减少的结果相矛盾。这一方面可能与性激素和 HPG 轴形成的负反馈调节有关;而另一方面则可能是因为硬骨鱼和其他哺乳动物类似,生殖细胞的形成还受到减数分裂的调控^[29]。因此,本研究进一步检测了减数分裂中关键调控基因的表达水平。视黄酸的合成与降解则关系到减数分裂的起始时间^[29],它的含量变化由视黄酸-合成酶基因 *aldh1a2* 和视黄酸-降解酶基因 *cyp26a1* 的表达调控^[30]。硬骨鱼类中 *sycp3* 基因编码的联会复合体蛋白 3 和 *dmcl* 基因编码的 DNA 减数分裂重组酶 1 通常被认为是减数分裂前期标记物^[31-32],其中 *sycp3* 基因主要调节减数分裂细胞分裂,而 *dmcl* 基因对于减数分裂中染色体的同源联会起关键作用^[33-34]。在本研究中,与对照组相比,Cd 暴露组的 *aldh1a2* 基因表达水平明显上调,而两者的 *cyp26a1* 基因表达水平没有明显变化,这表明视黄酸在鱼体中的含量可能受到 *aldh1a2* 基因的调控而明显升高,进而导致减数分裂的起始加强^[35]。同时,Cd 暴露导致 *sycp3* 基因表达水平较对照组而言有明显下降,表明斑马鱼精子发生在减数分裂的早期阶段可能被阻断,从而引起早期生殖细胞增多和精子减少的组织学变化。因此,本研究表明,*aldh1a2* 基因上调和 *sycp3* 基因下调可能是 Cd 暴露导致精巢中早期生殖细胞增多而精子减少的重要原因。

综上所述,本研究结果表明,低剂量 Cd 暴露可通过调节 HPG 轴及减数分裂关键基因的表达水平引起斑马鱼精巢的组织学损伤和血浆雄激素质量浓度异常。尽管本研究所设 Cd 质量浓度符合国家渔业水质标准限值,但仍能干扰雄性斑马鱼的生殖内分泌。因此,低剂量 Cd 暴露对鱼类的生殖风险仍值得关注。

参考文献:

- [1] JIN Y, LIN Z, LIU F, et al. Embryonic exposure to cadmium (II) and chromium (VI) induce behavioral alterations, oxidative stress and immunotoxicity in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Neurotoxicology and Teratology*, 2015, 48: 9-17.
- [2] MA W, WANG L, HE Y, et al. Tissue-specific cadmium and metallothionein levels in freshwater crab *Sinopotamon henanense* during acute exposure to waterborne cadmium [J]. *Environmental Toxicology*, 2008, 23(3): 393-400.
- [3] SPITSBERGEN J M, KENT M L. The state of the art of the zebrafish model for toxicology and toxicologic pathology research—advantages and current limitations [J]. *Toxicologic Pathology*, 2003, 31(suppl): 62-87.
- [4] 谢冬梅, 龚仕玲, 李英文, 等. 镉诱导斑马鱼肝脏的组织学损伤和氧化应激 [J]. *重庆师范大学学报(自然科学版)*, 2018, 35(4): 31-36.
XIE D M, GONG S L, LI Y W, et al. Cadmium induces histological damage and oxidative stress in the liver of zebrafish [J]. *Journal of Chongqing Normal University (Natural Science)*, 2018, 35(4): 31-36.
- [5] 梁晓敏, 曾凤, 张群芳, 等. 汞镉联合暴露对斑马鱼性腺组织学和抗氧化酶基因表达的影响 [J]. *重庆师范大学学报(自然科学版)*, 2018, 35(3): 58-63.
LIANG X M, ZENG F, ZHANG Q F, et al. Effects of combined exposure to mercury and cadmium on histology and the expression of antioxidative enzyme genes in gonads of zebrafish [J]. *Journal of Chongqing Normal University (Natural Science)*, 2018, 35(3): 58-63.
- [6] DIETRICH J, DIETRICH M, KOWALSKI K, et al. Exposure of rainbow trout milt to mercury and cadmium alters sperm motility parameters and reproductive success [J]. *Aquatic Toxicology*, 2010, 97(4): 277-284.
- [7] TILTON S C, FORAN C M, BENSON W H. Effects of cadmium on the reproductive axis of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2003, 136(3): 265-276.
- [8] WITESKA M, JEZIEBSKA B, CHABER J. The influence of cadmium on common carp embryos and larvae [J]. *Aquaculture*, 1995, 129(1/2/3/4): 129-132.
- [9] ZHANG Q F, LI Y W, LIU Z H, et al. Reproductive toxicity of inorganic mercury exposure in adult zebrafish: histological damage, oxidative stress, and alterations of sex hormone and gene expression in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis [J]. *Aquatic Toxicology*, 2016, 177: 417-424.
- [10] MEIER S, MORTON H C, ANDERSSON E, et al. Low-

- dose exposure to alkylphenols adversely affects the sexual development of Atlantic cod (*Gadus morhua*): acceleration of the onset of puberty and delayed seasonal gonad development in mature female cod[J]. *Aquatic Toxicology*, 2011, 105(1/2):136-150.
- [11] GEOFFROY-SIRAUDIN C, PERRARD M H, GHALAMOUN-SLAIMI R, et al. *Ex-vivo* assessment of chronic toxicity of low levels of cadmium on testicular meiotic cells[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2012, 262(3):238-246.
- [12] 刘昌盛, 穆宇, 杜久林. 斑马鱼在生命科学研究中的应用[J]. *生命科学*, 2007, 19(4):382-386.
LIU C S, MU Y, DU J L. Application of zebrafish in life science research[J]. *Life Science*, 2007, 19(4):382-386.
- [13] CHEN Y Y, CHAN K M. Regulation of vitellogenin (*vtg1*) and estrogen receptor (*er*) gene expression in zebrafish (*Danio rerio*) following the administration of Cd²⁺ and 2, 3, 7, 8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) [J]. *Chemosphere*, 2016, 147:467-476.
- [14] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the method[J]. *Methods*, 2001, 25(4):402-408.
- [15] 骆晓燕, 谢勇平, 方展强. 镉暴露对食蚊鱼生长发育的影响[J]. *天津农业科学*, 2013, 19(10):1-6.
LOU X Y, XIE Y P, FANG Z Q. Effects of cadmium exposure on the growth and development of mosquito fish [J]. *Tianjin Agricultural Science*, 2013, 19(10):1-6.
- [16] YÖNN D, AKBULUT C, KAYMAK G, et al. Histopathological effects of cadmium exposure on testis tissue of swordtail fish, *Xiphophorus helleri* (Pisces: Poeciliidae) [J]. *Fresenius Environmental Bulletin*, 2015, 24(6 A):2133-2137.
- [17] KUMARI M, DUTT N H G. Cadmium-induced histomorphological changes in the testis and pituitary gonadotrophic hormone secreting cells of the cyprinid *Puntius sarana* [J]. *Italian Journal of Zoology*, 1991, 58(1):71-76.
- [18] HACHFI L, COUVRAY S, SIMIDE R, et al. Impact of endocrine disrupting chemicals (EDCs) on hypothalamic-pituitary-gonad-liver (HPGL) axis in fish[J]. *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 2012, 4(1):14-30.
- [19] ACHERMANN J C, JAMESON J L. Fertility and infertility: genetic contributions from the hypothalamic-pituitary-gonadal axis[J]. *Molecular Endocrinology*, 1999, 13(6):812-818.
- [20] MIURA T, MIURA C I. Molecular control mechanisms of fish spermatogenesis[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2003, 28(1/2/3/4):181-186.
- [21] BILLARD R, FOSTIER A, WEIL C, et al. Endocrine control of spermatogenesis in teleost fish[J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1982, 39(1):65-79.
- [22] NAGAHAMA Y. Endocrine regulation of gametogenesis in fish[J]. *International Journal of Developmental Biology*, 2002, 38(2):217-229.
- [23] NAGAHAMA Y. Gonadal steroid hormones: major regulators of gonadal sex differentiation and gametogenesis in fish[C]//Norberg B, Kjesbu O S, Taranger G L, et al. Proceedings of the 6th international symposium on the reproductive physiology of fish; 2000 July 4-9. Bergen, Norway; John Grieg A/S, 2000:211-222.
- [24] SCHULZ R W, DE FRAN? A L R, LAREYRE J J, et al. Spermatogenesis in fish[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 165(3):390-411.
- [25] BORG B. Androgens in teleost fishes[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 1994, 109(3):219-245.
- [26] SELLIN M K, KOLOK A S. Cd exposures in fathead minnows; effects on adult spawning success and reproductive physiology[J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2006, 51(4):594-599.
- [27] SCOTT A P, BYE V J, BAYNES S M, et al. Seasonal variations in plasma concentrations of 11-ketotestosterone and testosterone in male rainbow trout, *Salmo gairdnerii* Richardson[J]. *Journal of Fish Biology*, 1980, 17(5):495-505.
- [28] FOSTIER A, BILLARD R, BRETON B. Plasma 11-oxotestosterone and gonadotrophin in relation to the arrest of spermiation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 1984, 54(3):378-381.
- [29] FENG R, FANG L, CHENG Y, et al. Retinoic acid homeostasis through *aldh1a2* and *cyp26a1* mediates meiotic entry in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [EB/OL]. [2018-09-26]. https://www.researchgate.net/publication/276357510_Retinoic_acid_homeostasis_through_aldh1a2_and_cyp26a1_mediates_meiotic_entry_in_Nile_tilapia_Oreochromis_niloticus.
- [30] KAJIURA-KOBAYASHI H, KOBAYASHI T, NAGAHAMA Y. Cloning of cDNAs and the differential expression of A-type cyclins and Dmcl during spermatogenesis in the Japanese eel, a teleost fish[J]. *Developmental Dynamics*, 2005, 232(4):1115-1123.
- [31] YOSHIDA K, KONDOH G, MATSUDA Y, et al. The mouse *reca*-like gene *dmcl* is required for homologous chromosome synapsis during meiosis[J]. *Molecular Cell*, 1998, 1(5):707-718.
- [32] LAUE L, LEE M F, Change C F, et al. Conserved sex-specific timing of meiotic initiation during sex differentiation in the protandrous black porgy *Acanthopagrus schlegelii*

[EB/OL]. [2018-09-26]. <https://academic.oup.com/biolreprod/article/88/6/150,%201-13/2514346>.

[33] SYRJÄNEN J L, PELLEGRINI L, DAVIES O R. A molecular model for the role of *syncp3* in meiotic chromosome organisation[EB/OL]. [2018-09-26]. <https://elifesciences.org/articles/02963>.

[34] LI G, CAO Z, LAN D, et al. Spatial variations in grain size distribution and selected metal contents in the Xiamen bay, China[J]. *Environmental Geology*, 2007, 52(8): 1559-

1567.

[35] 张群芳, 尹盼, 李英文, 等. 多种环境雌激素低剂量联合处理诱导斑马鱼精子发生障碍[J]. *重庆师范大学学报(自然科学版)*, 2016, 33(3): 20-26.

ZHANG Q F, YIN P, LI Y W. Combined treatment of low dose of environment estrogens induced spermatogenic dysplasia in zebrafish[J]. *Journal of Chongqing Normal University (Natural Science)*, 2016, 33(3): 20-26.

Animal Sciences

The Interference of Low Dose of Cadmium Exposure on the Reproductive Endocrine of Male Zebrafish

AN Jingjing, XIE Dongmei, LI Yingwen, CHEN Qiliang

(Chongqing Key Laboratory of Animal Biology, College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract: [Purposes] To evaluate the effects of low dose cadmium exposure on reproductive endocrine of adult male zebrafish (*Danio rerio*). [Methods] Adult male zebrafish were exposed to $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ cadmium ion (Cd^{2+}) for 30 days, and the histological structure of testis, plasma mass concentration of 11-ketotestosterone (11-KT), hypothalamic-pituitary-gonad (HPG) axis, and transcriptional levels of key genes in meiosis were analyzed. [Findings] Compared with the control group, the testis tissue of the cadmium exposed group showed changes such as increase of early germ cells, decrease of sperm quantity and lacuna. Plasma 11-KT level increased compared with the control group and statistical significance ($p < 0.05$). In addition, cadmium exposure raised the expression of retinoic acid synthetase gene *aldh1a2* and HPG axis key gene *gnrh2*, *fsh β* , *lh β* , *fshr*, *lhr*, *ar* level, decreased the synaptonemal complex protein 3 *syncp3* gene expression level, the differences statistically significant ($p < 0.05$), while the HPG axis key gene *gnrh3*, DNA meiosis recombinant enzyme 1 gene *dmc1* and retinoic acid degradation enzyme gene *cyp26b1* were not statically different from that of the control group. [Conclusions] Low dose cadmium exposure interferes with the reproductive endocrine of adult male zebrafish by regulating the expression level of HPG axis and key genes of meiosis.

Keywords: zebrafish; low dose cadmium exposure; HPG axis; meiosis; reproductive endocrine

(责任编辑 方 兴)

短期捕食胁迫对中华倒刺鲃幼鱼行为特征的影响*

易恋淳, 肖玲韬, 付世建, 付成

(重庆师范大学 进化生理与行为学实验室重庆市动物生物学重点实验室, 重庆 401331)

摘要:【目的】考查短期非致命性捕食胁迫对中华倒刺鲃(*Spinibarbus sinensis*)幼鱼行为特征的影响。【方法】将体质量为(5.42±0.23)g的中华倒刺鲃幼鱼随机分为捕食组和对照组,分别在有、无捕食胁迫存在情况下驯化25d,随后分别测定了两组实验鱼的活跃性、探索性、勇敢性、觅食行为以及偏好行为。【结果】相比对照组,捕食组表现出更高的活跃性和探索性,以及更低的勇敢性,且有关差异均具统计学意义($p < 0.05$),而捕食组与对照组的觅食行为与偏好行为的差异无统计学意义。【结论】短期捕食胁迫使中华倒刺鲃的活跃性和探索性明显提高,提示中华倒刺鲃可能通过增加对捕食者的探索行为和维持较高的活跃性来应对短期捕食胁迫,这种较为积极的行为策略可能与此种鱼较强的运动能力有关。捕食胁迫未对中华倒刺鲃的觅食行为和偏好行为产生明显影响。在非致命性捕食胁迫下,中华倒刺鲃维持觅食以保障生长可能是为了确保低捕食强度下的长期生存。

关键词:捕食胁迫;行为特征;中华倒刺鲃

中图分类号:Q954.3

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2019)02-0030-06

在自然界中,鱼类经常面临捕食胁迫,尤其在幼鱼阶段,捕食胁迫常常会导致鱼类大量死亡^[1]。为应对捕食胁迫,鱼类可能会在形态、运动能力、生活史策略等方面表现出对捕食胁迫的响应,其中鱼类的反捕食行为可塑性较强,且较为高效,因此备受研究者关注^[2-4]。一些研究者认为:处于捕食胁迫下的猎物鱼会降低活跃性、探索性和勇敢性,并增加隐匿行为以降低被捕食者发现的机率^[5-6]。然而这些反捕食行为都是有代价的,因为降低的活跃性、探索性和勇敢性以及增加的隐匿行为均会导致觅食机会的减少,进而影响生长^[7],生长的受阻势必会影响鱼类的长期生存。因此,鱼类的生长和生存之间可能存在权衡。再考虑到鱼类的自然栖息地环境复杂多样且不同栖息地中捕食强度差异也非常巨大,从而可以提出以下问题:捕食强度是否会对鱼类生长与生存的权衡产生影响?在非致命性的捕食胁迫下鱼类是否会在行为上优先保证生长?

中华倒刺鲃(*Spinibarbus sinensis*)是一种主要分布在中国长江上游及支流的常见鲤科(Cyprinidae)鱼类,营底栖杂食性。在它的幼鱼阶段,捕食胁迫普遍存在,而它栖息的水底遍布水草石子等隐蔽场所^[8]。前期研究表明中华倒刺鲃具有较强的生理和行为可塑性,因此是一种较为理想的实验对象^[9]。乌鳢(*Ophiocephalus argus*)属于鲈形目(Perciformes)鳢科(Channidae)鱼类,广泛分布于亚洲,且与中华倒刺鲃在自然界存在天然的捕食关系^[10]。本研究以中华倒刺鲃幼鱼为猎物鱼,乌鳢为捕食者,考查短期捕食胁迫即25d的捕食者暴露处理对中华倒刺鲃幼鱼活跃性、探索性、勇敢性、觅食行为和偏好行为的影响,并探讨捕食胁迫下鱼类的行为适应策略,从而为鱼类行为学的相关研究提供有价值的基础资料^[11]。

1 材料与方法

1.1 实验鱼来源与驯养

实验用中华倒刺鲃、乌鳢均购于重庆当地水产养殖基地,在实验室自制循环过滤控温水槽(容积1000L)中分开驯养90d以充分适应实验室环境。每日用曝气后自来水更换水槽内20%体积的驯养水体,水温控制范围

* 收稿日期:2018-09-01 修回日期:2019-02-11 网络出版时间:2019-03-15 07:00

资助项目:国家自然科学基金(No. 31670418; No. 31700340);重庆市科学技术委员会基础科学与前沿技术研究项目(No. cstc2017jcyjAX0474);重庆市教育委员会科技项目(No. KJ1600312)

第一作者简介:易恋淳,女,研究方向为鱼类生理生态学, E-mail: ylc_cs@cqnu.edu.cn; 通信作者:付成,男,讲师,博士, E-mail: chengfu@cqnu.edu.cn

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20190315.0057.036.html>

为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$,光照周期为 12 h 光照:12 h 黑暗。每日 9:00 以商业饵料搭配赤虫(*Tubifex tubifex*)饱足投喂中华倒刺鲃 1 次,1 h 后捞出残渣和粪便。乌鳢使用商业饵料搭配白鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)肉片每 2 天投喂 1 次。

1.2 捕食胁迫处理

驯养结束后挑选身体健康、大小接近的中华倒刺鲃幼鱼随机分为对照组和捕食组,随后将两组实验鱼转至相同规格的两个水槽中,分别在各自水槽中进行为期 25 d 有、无捕食胁迫的驯化。用铁丝网将水槽一分为二,捕食组一侧为中华倒刺鲃,另一侧为乌鳢($n=10$,体长 20~30 cm);对照组一侧为中华倒刺鲃,另一侧空白。对照组与捕食组相比,除无捕食者外,其他所有环境均相同。在 25 d 的驯化期间内,实验鱼的养殖条件与前期驯养阶段保持一致。驯化结束后,分别对对照组($n=25$,体长: (6.40 ± 0.12) cm,体质量: (5.41 ± 0.23) g)和捕食组($n=25$,体长: (6.18 ± 0.14) cm,体质量: (5.42 ± 0.24) g)实验鱼的活跃性、探索性、勇敢性、觅食行为和偏好行为进行测定。

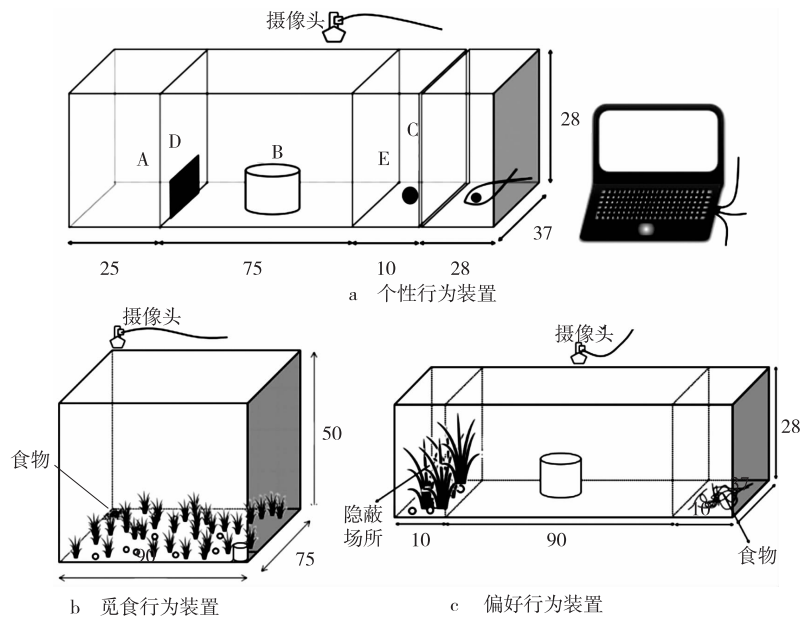
1.3 实验装置和行为测定方法

1.3.1 活跃性、探索性和勇敢性

实验装置(图 1a)包含左侧测定水槽(规格:110 cm \times 37 cm \times 28 cm)和右侧捕食者刺激水槽(规格:28 cm \times 37 cm \times 28 cm),水槽内壁(两水槽贴合处对应内壁除外)贴满白色广告纸保证水槽不透明,营造封闭空间使实验过程中实验鱼不受外界环境干扰。水面高 10 cm,用白色板 D,E 将左侧测定水槽分隔为 A,B,C 共 3 个区域(A 区规格:25 cm \times 37 cm \times 28 cm;B 区规格:75 cm \times 37 cm \times 28 cm;C 区规格:10 cm \times 37 cm \times 28 cm)。其中分隔 A,B 区域的 D 板下方具有可人工开启的小门(图 1a 中 D 板下黑色部分)。C 区域内靠中间位置提前放入 1 个新奇物体(长尾夹)。捕食者刺激水槽位于测定水槽右侧,实验前用 1 块黑板将两水槽隔开。B,C 区域正上方架设摄像头(webcam 9000,Logitech,下同)并接入计算机,用以拍摄实验鱼的行为。将禁食 1 d 的单尾实验鱼放入 B 区域的透明亚克力圆筒内适应 15 min,随后撤走圆筒,并同时打开摄像头对实验鱼的活跃性进行拍摄,持续 16 min;完成上述步骤后撤走 E 板,暴露新奇物体,记录实验鱼对新奇物体的探索行为,持续 21 min;最后撤走两测定水槽之间的黑色隔板,暴露乌鳢,开启 D 板下的小门,将渔网快速浸入水中(模拟一次捕食者袭击),将鱼赶入 A 区内,随后记录实验鱼首次从隐蔽区(A 区)进入开放区(B 区)的时间和在开放区的累计停留时间等参数作为勇敢性衡量指标。

1.3.2 觅食行为 实验装置(图 1b)为自制方形亚克力水槽(规格:90 cm \times 75 cm \times 50 cm),水槽内壁贴满白色广告纸保证水槽不透明,营造封闭空间使实验过程中实验鱼不受外界环境干扰。水面高 10 cm,于缸底的 4 个角随机取两处 10 cm \times 10 cm 区域,两区域呈对角线分布,分别为食物区与适应区。食物区放满赤虫,适应区放入透明亚克力圆筒。其他区域布满人工低矮水草和石子。食物区的水面上方架设摄像头并接入计算机。正式实验开始后,将禁食 1 d 的单尾实验鱼放入适应区的透明亚克力圆筒内,适应感知周围环境 30 min 后,轻轻取出亚克力圆筒,同时打开摄像头对实验鱼的觅食行为进行持续 41 min 的拍摄。

1.3.3 偏好行为 实验装置(图 1c)为自制方形亚克力水槽(规格:110 cm \times 35 cm \times 28 cm),内壁处理方式与觅食行为测定装置相同。水面高 10 cm,在水槽两侧插入透明亚克力板,将整个水槽区域分隔成左(规格:15 cm \times



注:个性行为装置中 A,B,C 均表示空间区域;D,E 表示白色隔板;图中数据单位为 cm

图 1 中华倒刺鲃幼鱼行为特征测定装置

Fig. 1 Experimental devices used to assess behavioral characteristics of juvenile *S. sinensis*

37 cm×28 cm),中(规格:90 cm×37 cm×28 cm),右(规格:15 cm×37 cm×28 cm)共 3 个区域。实验时左侧或右侧区域布满石子和高大阔叶水草,模拟水底隐蔽场所;另一侧区域放入赤虫;中间区域为实验鱼活动空间,区域内放置有透明亚克力圆筒,作为实验鱼的适应区域。装置正上方架设摄像头并接入计算机。将禁食 1 d 的单尾实验鱼放入中间区域的圆筒内适应 30 min 后,轻轻拿出圆筒,同时打开摄像头拍摄 31 min。

1.4 数据处理

为了避免人为取出透明亚克力圆筒的过程对实验鱼的干扰,将实验中所记录视频的初始 1 min 片段舍弃。所有视频帧率均为 15 帧·s⁻¹;用“格式工厂”软件(http://format-factory.softonic.cn)将视频由 wmv 格式转码为 avi 格式后,导入行为学软件 EthoVision XT 9(Nodus, Netherlands)进行视频分析。软件可自动追踪实验鱼实时坐标,并根据实验鱼坐标计算相关行为学参数(表 1)。

表 1 行为特征指标描述
Tab.1 The description of behavioral characteristics

行为	参数	单位	描述
活跃性	平均游泳速度	cm·s ⁻¹	实验鱼在单位时间内的运动路程与时间的比值
	运动时间比	%	实验鱼处于运动状态的累计时间与总时间的比值
探索性	新奇度	cm	实验鱼与新奇物体的平均距离
	探索区停留时间	min	实验鱼进入探索区的累计时间
勇敢性	暴露时间	min	实验鱼停留在开放区域的累计时间
	潜伏期	min	实验鱼首次进入开放区域的时间
觅食行为	觅食次数	次	实验鱼进入食物区的次数
	觅食潜伏比	%	实验鱼首次进入食物区的时间与总拍摄时间的比值
偏好行为	食物区累计停留时间比	%	实验鱼停留在食物区的累计时间与总拍摄时间的比值
	距食物平均距离	cm	实验鱼距离 C 区赤虫的平均距离
	距隐蔽场所平均距离	cm	实验鱼距离 A 区隐蔽场所的平均距离

1.5 统计分析

所有实验数据均由 Excel 2010 进行常规计算后,由 SPSS 17.0 软件进行统计分析。经协方差分析发现体质量对实验鱼各行为参数均无统计学意义上的影响,故对照组与捕食组之间的差异比较采用独立样本 *t* 检验来进行分析。结果数据均采用“平均值±标准误”的方式表示,当 $p < 0.05$ 时,统计分析结果具有统计学意义。

2 结果

2.1 对活跃性的影响

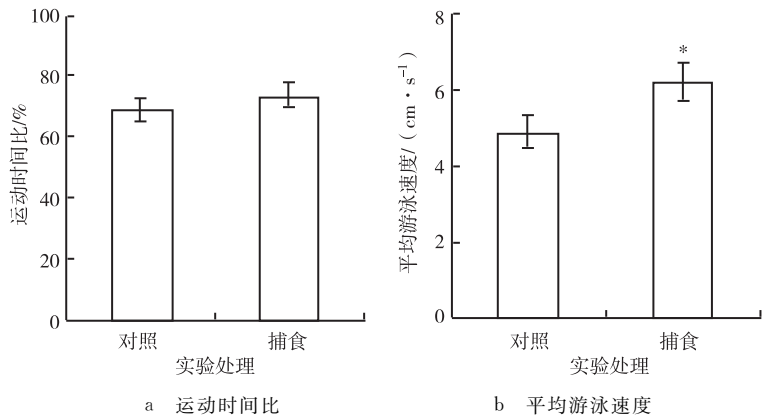
与对照组相比,中华倒刺鲃幼鱼在经历短期捕食胁迫后运动时间比无统计学意义上的变化(图 2a),但平均游泳速度有统计学意义上的提高($p < 0.05$)(图 2b)。

2.2 对探索性的影响

与对照组相比,中华倒刺鲃幼鱼在经历短期捕食胁迫后新奇度有统计学意义上的下降($p < 0.05$)(图 3a),但探索区停留时间无统计学意义上的变化(图 3b)。

2.3 对勇敢性的影响

中华倒刺鲃幼鱼在经历短期捕食胁迫后与对照组相比暴露时间有统计学意义上的减少($p < 0.05$)(图 4a),



注: * 表示对照组与捕食组之间差异具有统计学意义,下同

图 2 短期捕食胁迫对中华倒刺鲃幼鱼活跃性的影响

Fig. 1 The effect of short-term predation stress on the activity of juvenile *S. sinensis*

但两组实验鱼的潜伏期差异无统计学意义(图 4b)。

2.4 对觅食行为的影响

本研究结果显示,觅食次数(图 5a)、觅食潜伏比(图 5b)和停留时间比(图 5c)在对照组与捕食组之间均无统计学意义上的差异。

2.5 对偏好行为的影响

图 6a,b 显示,对照组与捕食组的距食物平均距离和距隐蔽场所平均距离两个参数均无统计学意义上的差异。

3 讨论

鱼类的反捕食行为与它生存能力密切相关^[12-13]。在面临捕食胁迫时,降低活跃性、探索性和勇敢性能减少鱼类自身活动,从而降低被捕食者发现的概率,进而有利于鱼类的生存^[14]。本研究发现,短期捕食胁迫对中华倒刺鲃幼鱼的活跃性、探索性和勇敢性均产生了明显影响。这表明中华倒刺鲃幼鱼的行为特征具有较好的可塑性,能对短期捕食胁迫做出反应。本研究中进行捕食胁迫处理后,中华倒刺鲃勇敢性明显降低,而活跃性和探索性明显提高。笔者推测活跃性和探索性的提高可能与中华倒刺鲃独特的行为适应策略有关——该物种通过提高探索性以增加对捕食者的了解,并维持较高的活跃性以时刻对捕食者保持警惕,随时准备逃跑。刘海生等人^[9]曾发现经过捕食者南方鲇(*Silurus meridionalis*)暴露处理的中华倒刺鲃活跃性明显提高,但隐匿行为明显减少。本研究结果与上述研究结果基本一致,提示中华倒刺鲃在面临捕食胁迫时的表现是一种较为积极的行为适应策略,可能与该物种较高的活跃性和较强的运动能力有关^[9,15]。

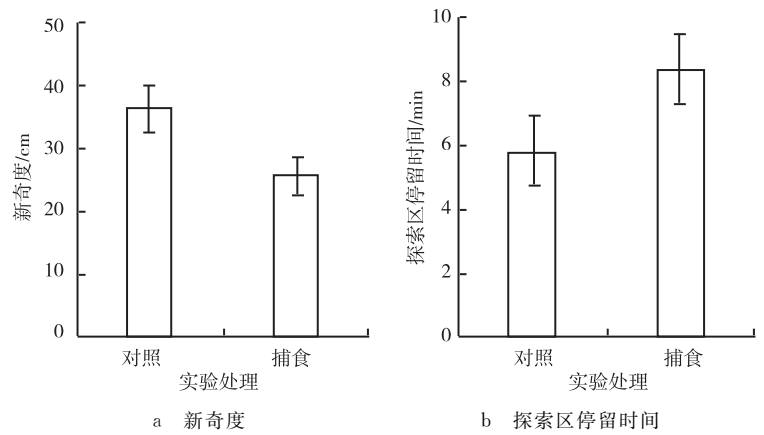


图 3 短期捕食胁迫对中华倒刺鲃幼鱼探索性的影响

Fig. 3 The effect of short-term predation stress on the exploration of juvenile *S. sinensis*

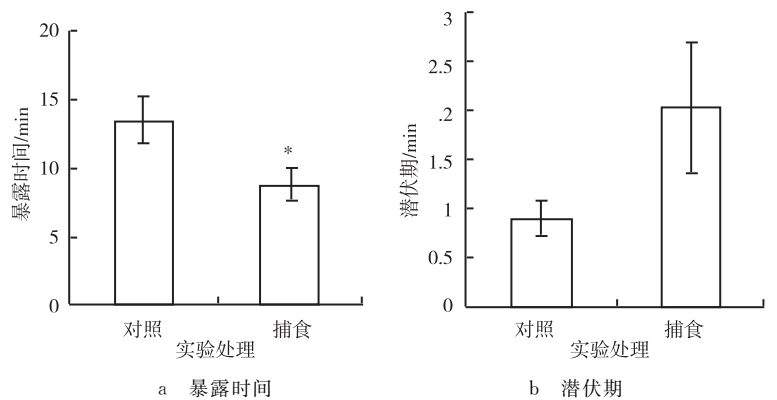


图 4 短期捕食胁迫对中华倒刺鲃幼鱼勇敢性的影响

Fig. 4 The effects of short-term predation stress on the boldness of juvenile *S. sinensis*

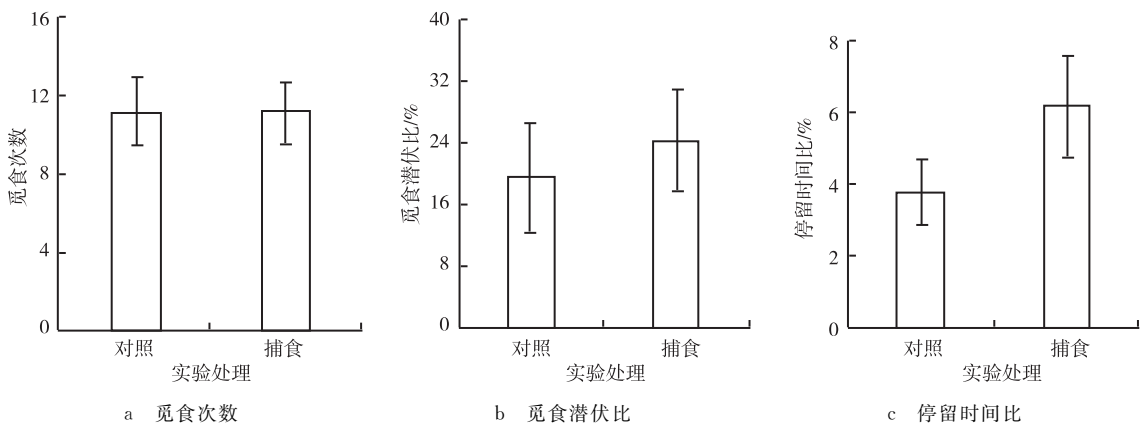


图 5 短期捕食胁迫对中华倒刺鲃幼鱼觅食行为的影响

Fig. 5 The effect of short-term predation stress on the foraging behavior of juvenile *S. sinensis*

鱼类通过获取食物实现生长。在高捕食压力的环境中,鱼类通常会减少觅食行为,以此获得更高的生存概

率。觅食活动会使鱼类更容易暴露行踪,并且觅食时鱼类很难发现迫近的捕食者,这些都会增加自身被捕食的风险^[16-17]。本研究中,捕食胁迫并未对中华倒刺鲃的觅食行为和偏好行为各项参数产生明显影响。因此,面对生存与生长之间的权衡,中华倒刺鲃并未牺牲觅食和生长。驯化结束时对照组与捕食组的体质量非常接近这一情况也进一步验证了上述结果。笔者推测这可能与实验中捕食者与猎物鱼隔开且捕食者对猎物鱼不能构成致命威胁有关。在没有致命捕食胁迫且食物充足的环境条件下,鱼类可通过大量摄食实现快速地生长。因为快速生长在自然界中有诸多生态学意义,例如由此可快速获得更大的体形从而在种内竞争中处于优势^[18],同时应对捕食压力时更大的体形也更为有利^[19]。当然本研究结果也提示:鱼类生存与生长之间的权衡可能存在着环境依赖性,鱼类并非总是牺牲生长来保证暂时的生存;在非致命性捕食胁迫下通过快速生长确保长期的生存可能是鱼类的另外一种反捕食行为策略。

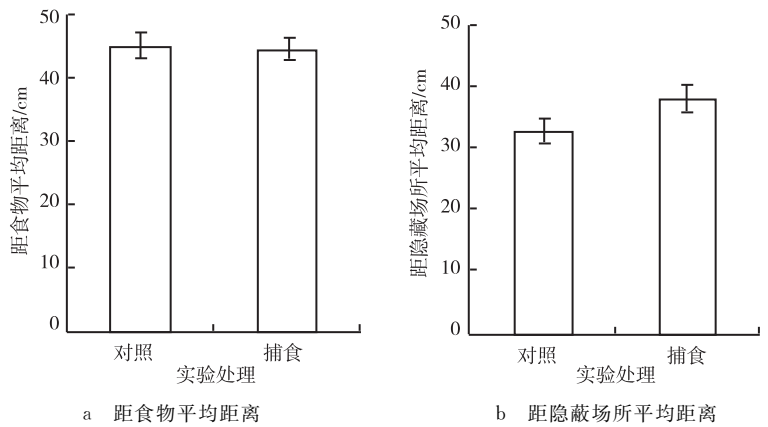


图 6 短期捕食胁迫对中华倒刺鲃幼鱼偏好行为的影响

Fig. 6 The effect of short-term predatory stress on the preference behavior of juvenile *S. sinensis*

参考文献:

- [1] MCGURK M P. Natural mortality of marine pelagic fish eggs and larvae; role of spatial patchiness[J]. Marine Ecology Progress Series, 1986, 34(4): 227-242.
- [2] FU C, FU S J, CAO Z D, et al. Habitat-specific anti-predator behavior variation among pale chub (*Zacco platypus*) along a river[J]. Marine & Freshwater Behaviour & Physiology, 2015, 48(4): 267-278.
- [3] ARCHARD G A, EARLEY R L, HANNINEN A F, et al. Correlated behaviour and stress physiology in fish exposed to different levels of predation pressure[J]. Functional Ecology, 2012, 269(3): 637-645.
- [4] LEHTINIEMI M. Swim or hide: predator cues cause species specific reactions in young fish larvae[J]. Journal of Fish Biology, 2005, 66(5): 1285-1299.
- [5] CSANVI V. Ethological analysis of predator avoidance by the paradise fish (*Macropodus opercularis* L.) I. recognition and learning of predators[J]. Animal Learning and Behaviour, 1986, 14(1): 101-109.
- [6] MILLIDINE K J, ARMSTRONG J D, METCALFE N B. Presence of shelter reduces maintenance metabolism of juvenile salmon[J]. Functional Ecology, 2006, 20(6): 839-845.
- [7] BILLERBECK J M, LANKFORD J T E, CONOVER D O. Evolution of intrinsic growth and energy acquisition rates. I. trade-offs with swimming performance in *Menidiemidna* [J]. Evolution, 2001, 55(9): 1863-1872.
- [8] 刘胜,付世建. 不同营养水平下中华倒刺鲃觅食和隐匿行为间的权衡[J]. 重庆师范大学学报(自然科学版), 2017, 34(5): 32-37.
- [9] LIU S, FU S J. The effect of nutritional status on the trade-off between foraging and shelter use behaviours in *Spinibarbus sinensis* [J]. Journal of Chongqing Normal University (Natural Science), 2017, 34(5): 32-37.
- [10] 覃英莲,彭韩柳依,付世建. 饥饿对捕食者鱼和猎物鱼快速启动游泳能力及捕食-逃逸行为的影响[J]. 生态学杂志, 2016, 35(9): 2429-2434.
- [11] QIN Y L, PENG-HAN L Y, FU S J. Effects of food deprivation on fast-start swimming predator-prey interaction between a predator and prey fish species[J]. Chinese Journal of Ecology, 2016, 35(9): 2429-2434.
- [12] 付成. 鱼类对捕食压力的生理和行为适应策略及其能量代谢机制[D]. 重庆:重庆大学, 2016.
- [13] FU C. The physiological and behavioral adaptation strategies of fish to predation pressures and energy metabolism mechanisms[D]. Chongqing: Chongqing University, 2016.
- [14] TANG Z H, HUANG Q, WU H, et al. The behavioral response of prey fish to predators: the role of predator size [EB/OL]. (2017-04-20)[2018-09-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5401624/>.

- [13] LONNSTDT O M, MCCORMICK M I, MEEKAN M G, et al. Learn and live; predator experience and feeding history determines prey behaviour and survival[J]. *Proceedings Biological Sciences*, 2012, 279(1736): 2091-2098.
- [14] ARCHARD G A, BRAITHWAITE V A. Increased exposure to predators increases both exploration and activity level in *Brachyrhaphis episcopi*[J]. *Journal of Fish Biology*, 2011, 78(2): 593-601.
- [15] YAN G J, HE X K, CAO Z D, et al. An interspecific comparison between morphology and swimming performance in cyprinids[J]. *Journal of Evolutionary Biology*, 2013, 26(8): 1802-1815.
- [16] PEACOR S D. Positive effect of predators on prey growth rate through induced modifications of prey behavior[J]. *Ecology Letters*, 2010, 5(1): 77-85.
- [17] KABY U, LIN D J. What limits predator detection in blue tits (*Parus caeruleus*): posture, task or orientation? [J]. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 2003, 54(6): 534-538.
- [18] ALONSO F, HONJI R M, GUIMARAES M R, et al. Dominance hierarchies and social status ascent opportunity; anticipatory behavioral and physiological adjustments in a Neotropical cichlid fish[J]. *Physiology and Behavior*, 2012, 106(5): 612-618.
- [19] SELDEN R L, GAINES S D, HAMILTON S L, et al. Protection of large predators in a marine reserve alters size-dependent prey mortality [EB/OL]. (2017-01-25) [2018-09-01], https://www.researchgate.net/publication/312933809_Protection_of_large_predators_in_a_marine_reserve_alters_size-dependent_preymortality.

Animal Sciences

Effects of Short-Term Predation Stress on Behavioral Characteristics of Juvenile *Spinibarbus sinensis*

YI Lianchun, XIAO Lingtao, FU Shijian, FU Cheng

(Laboratory of Evolutionary Physiology and Behavior, Chongqing Key Laboratory of Animal Biology, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract: [Purposes] To investigate the effects of predation stress on behavioral characteristics in juvenile *Spinibarbus sinensis*. [Methods] Juvenile *S. sinensis* ((5.42 ± 0.23) g) were divided into predation and control groups randomly and then acclimated with (or without) predation stress for 25 days. The activity, exploration, boldness, foraging behavior and preference behavior of both groups were measured respectively. [Findings] The juvenile *S. sinensis* of predation group showed significantly higher activity and exploration, and lower boldness compared with those of the control group. While no significant difference was found in foraging behavior and preference behavior between predation and control groups. [Conclusions] The activity and exploration of *S. sinensis* both increased due to short-term predation stress, it suggests that *S. sinensis* may improve the predator exploration and keep higher activity and vigilance to cope with predators, this kind of anti-predator strategy may be associated with its super locomotion performance. The foraging behavior and preference behavior did not change due to predation stress, it suggests that ensure growth to ensure long-term survival under non-lethal predation stress may be the other kind of anti-predator strategy.

Keywords: predation stress; behavioral characteristics; *Spinibarbus sinensis*

(责任编辑 方 兴)

柞蚕微孢子虫基因组 LTR 反转座子鉴定与进化分析*

周俊, 石鹏, 张爽, 许金山, 张小燕

(重庆师范大学 重庆市媒介昆虫重点实验室 重庆市动物生物学重点实验室, 重庆 401331)

摘要:【目的】鉴定柞蚕微孢子虫(*Nosema pernyi*)基因组中 LTR 反转座子的种类、数量和遗传关系。【方法】从 GenBank 数据库下载柞蚕微孢子虫基因组序列,采用 MGEScan 软件筛选潜在重复元件,通过 NCBI-BLAST 与不同物种的逆转酶进行比对,含有逆转录酶结构域的序列认定为 LTR 反转座子,并探讨它们的结构特征、所属类型和基因组分布特点。【结果】从柞蚕微孢子虫基因组中共发现 6 个 LTR 反转座子家族即 Nar1, Nar2, Nar3, Nar4, Nar5 和 Nar6,长度在 3~4 kb 之间;大部分家族有相似的 LTR 末端核苷酸,但靶位点重复和拷贝数存在差异;逆转录酶结构域系统进化树显示 6 个 LTR 反转座子家族均属于 Ty3/Gypsy 类型,且与家蚕微孢子虫(*Nosema bombycis*)LTR 反转座子形成姊妹分支;Nar2 和 Nar4 家族在基因组上成串排列,具有相似分布特征。【结论】柞蚕微孢子虫基因组中存在 Ty3/Gypsy 类型的 LTR 反转座元件,进化地位与家蚕微孢子虫最为接近;LTR 反转座子家族重复元件在基因组上成串排列,可能是柞蚕微孢子虫基因组扩张的潜在因素之一。

关键词: LTR 反转座子;柞蚕微孢子虫;基因组;系统进化

中图分类号: Q175

文献标志码: A

文章编号: 1672-6693(2019)03-0029-07

转座因子是一段可以从染色体基因组某一位点转移到另一位点并影响转座位点周围相关基因功能的 DNA 序列,研究发现至少有 40% 以上的人类基因组序列为转座因子,而在一些植物基因组中,这一比例达到 70% 以上^[1-2]。根据转座机制的不同和是否形成 RNA 转座中间体,可将转座子主要分为两大类:一类为 DNA 转座子,主要通过剪切-粘贴模式完成自身在基因组上的转座;第二类为反转座子,主要以复制-粘贴模式通过转录和反转录过程形成新的转座子拷贝,并插入到基因组新的转座位点从而完成转座过程。反转座子可以划分为 LTR 反转座子(Long terminal direct repeat retrotransposon)和 Non-LTR 反转座子。LTR 反转座子主要包含 5 个超家族:Ty1/Copia (Pseudoviridae), Ty3/Gypsy (Metaviridae), Bel/Pao, Retroviral 和 ERV (Endogenous retroviral)^[3]。一般而言,转座因子选择基因组的某一插入位点进行转座时,会导致插入该点处的一段短核苷酸片段发生自我复制;就 LTR 反转座子而言,该片段长度通常在 4~6 bp 之间,被称之为靶位点重复(Target site duplication),它的存在已成为转座因子的特性之一。早期研究认为转座因子是一种自私 DNA 序列(Selfish DNA)或者垃圾 DNA 序列(Junk DNA),但越来越多的研究表明,转座因子对基因组和基因进化起到积极作用,在许多动物和植物中,转座子不仅能通过特殊的途径重组基因组,而且能转座入完整基因的内部,进而影响基因的结构及功能^[4-7]。

柞蚕微孢子虫(*Nosema pernyi*)是引起柞蚕微孢子虫病的主要病原体,也是柞蚕生产中重要的检疫对象^[8],主要通过经口传染和胚种传染两种传播途径感染柞蚕^[9],极易造成柞蚕丝茧减产,危害中国的柞蚕生产。关于微孢子虫进化地位研究一向是人们关注的焦点。早先研究者根据微孢子 SSUrRNA 系统进化分析并结合微孢子缺乏线粒体和过氧化物酶特点,认为微孢子属于原生物^[10]。而后更多分子生物学证据,比如发现 5S rRNA 为典型真核生物型, β -微管蛋白和 RNA 聚合酶 II 大亚基与真菌最为接近,发现线粒体型 HSP70 编码基因等,使人

* 收稿日期:2019-03-10 修回日期:2019-04-12 网络出版时间:2019-05-09 19:30

资助项目:重庆市基础与前沿研究计划项目(No. cstc2015jcyjA80020)

第一作者简介:周俊,男,研究方向为生物化学与分子生物学, E-mail: sjzhou2010@163.com;通信作者:张小燕,女,副教授, E-mail: xyzhang18@163.com

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20190509.1930.044.html>

们提出了微孢子是真菌或真菌的类似物中分化而来,微孢子虫更接近真菌的新观点^[11-13]。

现阶段在基因组水平上研究转座子而涉及的简单真核生物中,多数与真菌类有关,且其中的 LTR 反转座子主要属于 Ty3/Gypsy 类^[14]。在新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)基因组中,有 15 个 LTR 反转座子家族和几个 Non-LTR 反转座子家族被发现^[15]。在白色念珠菌(*Candida albicans*)基因组中则至少有 34 个反转座子家族被发现^[16],而且高温环境和抑菌剂咪康唑能分别诱导其中的 Tac4 家族与 Zorro2 家族转录激活,从而增强了该菌种的适应性^[17]。此外,在家蚕微孢子虫(*Nosema bombycis*)基因组中相继发现 14 个结构完整的 LTR 反转座子家族以及其他类型的转座子^[18-19],而后续研究则揭示转座子家族的扩增是家蚕微孢子虫基因组扩张的原因之一^[20]。目前关于柞蚕微孢子虫反转座子的报道很少,而且只报道了柞蚕微孢子虫基因组中存在 1 个 LINE 反转座子家族 R4Na^[21],但有关 LTR 反转座子的研究罕有报道。为此,本研究利用生物信息学技术,发掘柞蚕微孢子虫基因组中存在的 LTR 反转座子,为进一步理解 LTR 反转座子在柞蚕微孢子虫基因组进化中的作用提供基础依据。

1 材料与方法

1.1 LTR 反转座元件的鉴定

本研究所使用的柞蚕微孢子虫全基因组和家蚕微孢子虫基因组下载自 Genbank 公共数据库,序列收录号为:ACJZ01000001~ACJZ01003558。首先,采用 MGEScan^[22] 搜索柞蚕微孢子虫全基因组序列,鉴定潜在的 LTR 反转座元件。再从 Pfam 数据库下载多物种的反转座酶(Reverse transcriptase, RT)序列,建库后采用 NCBI-BLAST 比对候选 LTR 反转座元件,确定是否含有 RT 序列。本研究将完整的 LTR 反转座子定义为序列内含有 RT 基因且两端拥有长末端重复(Long terminal repeat, LTR)。家族分类参照前人采用的标准,即不同 LTR 反转座子成员内 RT 结构域的氨基酸相似性达到 90% 以上就视为同一家族^[23]。采用 Repeatmasker 重复序列查找软件^[24] 分析特定转座子家族在基因组上的拷贝个数;拷贝片段长度在 100 bp 以上的,相似性达到 90% 以上,定义为 1 个拷贝。多重序列的比对使用 ClustalX2 软件^[24],可视化结果由 BoxShade 3.21 软件生成^[25]。

1.2 系统进化树分析

从 GenBank 公共数据库下载现有 Ty1/Copia, Ty3/Gypsy, Bel/Pao 和 Retroviral 的 LTR 反转座子超家族中反转录酶结构域序列,结合本研究中已鉴定到的柞蚕微孢子虫 LTR 反转座子中的 RT 结构域序列,采用 MEGA 6.0 软件^[26] 建立 Neighbor-joining 系统进化树,选用 No. of differences 模型且 bootstrap 值设为 100。

1.3 LTR 反转座元件分布特征分析

以拷贝数较少和拷贝数较多的 LTR 反转座子家族为例,将两者及它们的拷贝子通过 NCBI-BLAST 与柞蚕微孢子虫基因组进行比对,靶定两个 LTR 反转座子家族及它们的拷贝子在基因组上的位置。靶定特定转座子及拷贝子位置后,查询基因组图谱上下游临近基因,并绘制特定 LTR 反转座子及基因分布图。

2 结果与分析

2.1 LTR 反转座元件鉴定和结构分析

LTR 反转座子主要编码 Pol 多聚蛋白来完成转座功能,该蛋白包含了多个催化结构域,其中以保守性强的 RT 为最重要特征。根据这一特点并结合反转座子结构的特异性,本研究在柞蚕微孢子虫基因组中鉴定到 6 个 LTR 反转座子家族,分别命名为 Nar1, Nar2, Nar3, Nar4, Nar5 和 Nar6。其中, Nar1, Nar2, Nar3, Nar4 和 Nar5 家族含有完整的转座子家族所具有的特征性序列即反向末端重复(Inverted terminal repeat)和靶位点重复序列(表 1)。研究结果还显示:柞蚕微孢子虫 LTR 反转座子的长度在 3~4 kb 之间;大部分家族的 LTR 末端核苷酸具有一致性,为 TGT/ACA 或 TG/CA;但家族间的靶位点重复序列在核苷酸数量和种类上则具有差异,长度为 5~6 个核苷酸(表 1)。此外,通过 RepeatMasker 软件对 LTR 转座子在柞蚕微孢子虫基因组上的拷贝个数进行了初步的统计,发现不同家族间拷贝子数量相差较大,其中拷贝子数量最多的为 Nar3 和 Nar4 家族,均为 16 个;而 Nar2 家族拷贝子数量最少,只有 3 个(表 1)。

表 1 柞蚕微孢子虫基因组 LTR 反转座子不同家族特征详细统计表

Tab. 1 Characteristics of long-terminal repeat retrotransposons from *N. pernyi* genome

家族	LTR 长度/bp	插入片段长度/bp	LTR 相似性/%	靶位点重复序列	LTR 末端核苷酸	拷贝数/个
Nar1	177/177	4 016	100	CTTATT/CTTATT	TGT/ACA	5
Nar2	281/280	4 352	98	AAAAG/AAAAG	TG/CA	3
Nar3	213/202	3 999	100	CCAAT/CCAAT	TG/CA	16
Nar4	177/132	3 036	94	TTTGT/GTTGT	TG/CA	16
Nar5	131/131	3 779	96	ATCTT/ATCTT	TGT/ACA	11
Nar6	451/451	2 705	99	—	—	4

在本研究鉴定到的 6 个 LTR 反转座子家族中, LTR 序列和功能结构域表现出特征差异(图 1)。表 1 显示: LTR 长度范围为 131~451 bp, 其中 LTR 长度最长和最短的 LTR 反转座子家族分别为 Nar6 和 Nar5。图 1 则显示, Nar1 和 Nar6 家族含有 RT 结构域和核糖核酸内切酶(RH)结构域共 2 个结构域, 而 Nar4 含有 Gag 结构域、蛋白酶(Pro)结构域、RT 结构域和整合酶(INT)结构域共 4 个结构域。尽管柞蚕微孢子虫 LTR 反转座子 pol 多聚蛋白包含的功能结构域具有差异性, 但已鉴定的 6 个 LTR 反转座子家族中均具有保守性较强的 RT 结构域, 且所有 LTR 反转座子家族的 RT 结构域含有 YXDD 保守基序(图 2a); RH 结构域中则拥有 DAS 保守基序(图 2b); Pro 结构域具有共有的 D(T/S)G 基序(图 2c)。不同 LTR 反转座子家族在基因组上拷贝数差异较大, 某些家族 LTR 的相似性差异较大, 如 Nar4 家族的为 94%(表 1)。因此推测: LTR 反转座子在较为久远的年代插入到柞蚕微孢子虫基因组中, 碱基经过长时间的进化突变, 导致高变异度序列不断积累, 并伴随有反转座子部分结构域丢失。

2.2 系统进化分析

利用柞蚕微孢子虫 LTR 反转座元件中 RT 结构域的保守性, 将该结构域与其他物种的 RT 序列构建系统进化树, 其中所涉及各物种的 RT 序列名称、所属物种拉丁学名及 Genbank 登录号如图 3 所示。图 3 还显示: 本研究所有物种基因组中 LTR 转座元件可以划分为 Ty3/Gypsy, Retrovirus, Ty1/Copia 和 Bel/Pao 等 4 个类群, 与前人报道一致^[27]; 柞蚕微孢子虫中新发现的 6 个 LTR 反转座子家族均属于 Ty3/Gypsy 类型, 且与近源物种家蚕微孢子虫基因组中的 Ty3 类型反转座子聚类在一起形成姊妹分支, 暗示柞蚕微孢子虫 LTR 反转座子起源与家蚕微孢子虫 LTR 反转座子相似, 属于真菌性起源^[13]。

2.2 系统进化分析

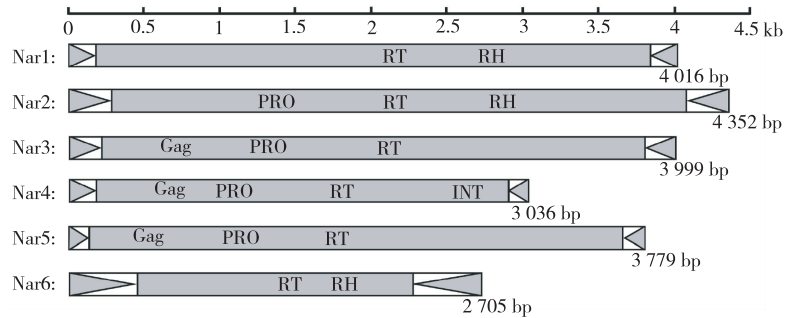
2.3 LTR 反转座子在基因组中的分布特征

选取拷贝数较少的 Nar2 家族和拷贝数较多的 Nar4 家族为代表, 对它们的反转座子及拷贝子进行全基因组定位, 考察柞蚕微孢子虫 LTR 反转座子在整个基因组的分布特征。结果显示, Nar2 家族在 Scaffold NA_040 上有 2 个拷贝, 在基因组上呈现出紧密排列的特征, 并且与其他 Nar 家族成簇分布(图 4a)。Nar4 家族反转座元件在 Scaffold NA_051 上紧密分布 2 个拷贝, 且与其他 4 个 Nar 家族成簇排列(图 4b)。推测是由于反转座子在基因组转座过程中受到进化选择, 趋向于集中在一起, 以防止基因组产生较大变异^[28-29]。

2.3 LTR 反转座子在基因组中的分布特征

3 讨论

柞蚕微孢子为寄生于柞蚕体内的一类原始真核生物, 在微孢子进化地位的研究上具有重要意义。本研究鉴定到 Nar1, Nar2, Nar3, Nar4, Nar5 和 Nar6 共 6 个柞蚕 LTR 反转座子家族, 长度在 3~4 kb 之间, 证实柞蚕微

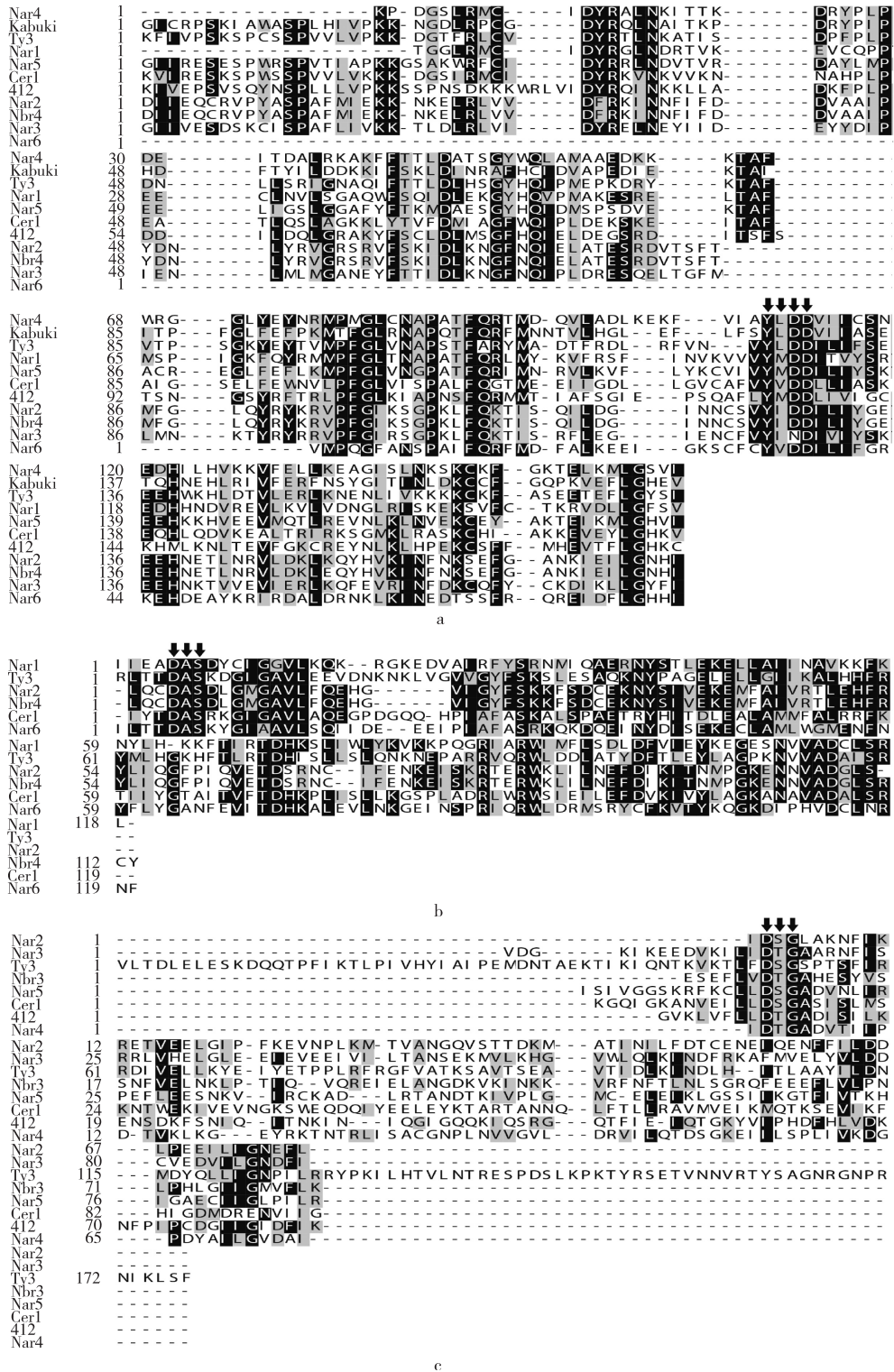


注: 带有三角形的框表示 LTR, 阴影框表示开放阅读框(ORF), 并用英文字母标出反转座子各个功能结构域在 ORF 内潜在的位置

图 1 柞蚕微孢子虫不同家族 LTR 反转座子结构

Fig. 1 The presentation of structure for several novel *N. pernyi* LTR retrotransposons

孢子虫基因组中存在完整的 LTR 反转座元件及片段复制。此前有研究报道,柞蚕微孢子虫基因组中存在 LINE 类反转座子 R4 家族,暗示柞蚕微孢子虫基因组中具有种类丰富的转座子类型^[21]。



注:Kabuki,Ty3,Cer1 和 412 分别代表 *Bombyx mori*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* 等物种中 LTR 反转座子序列

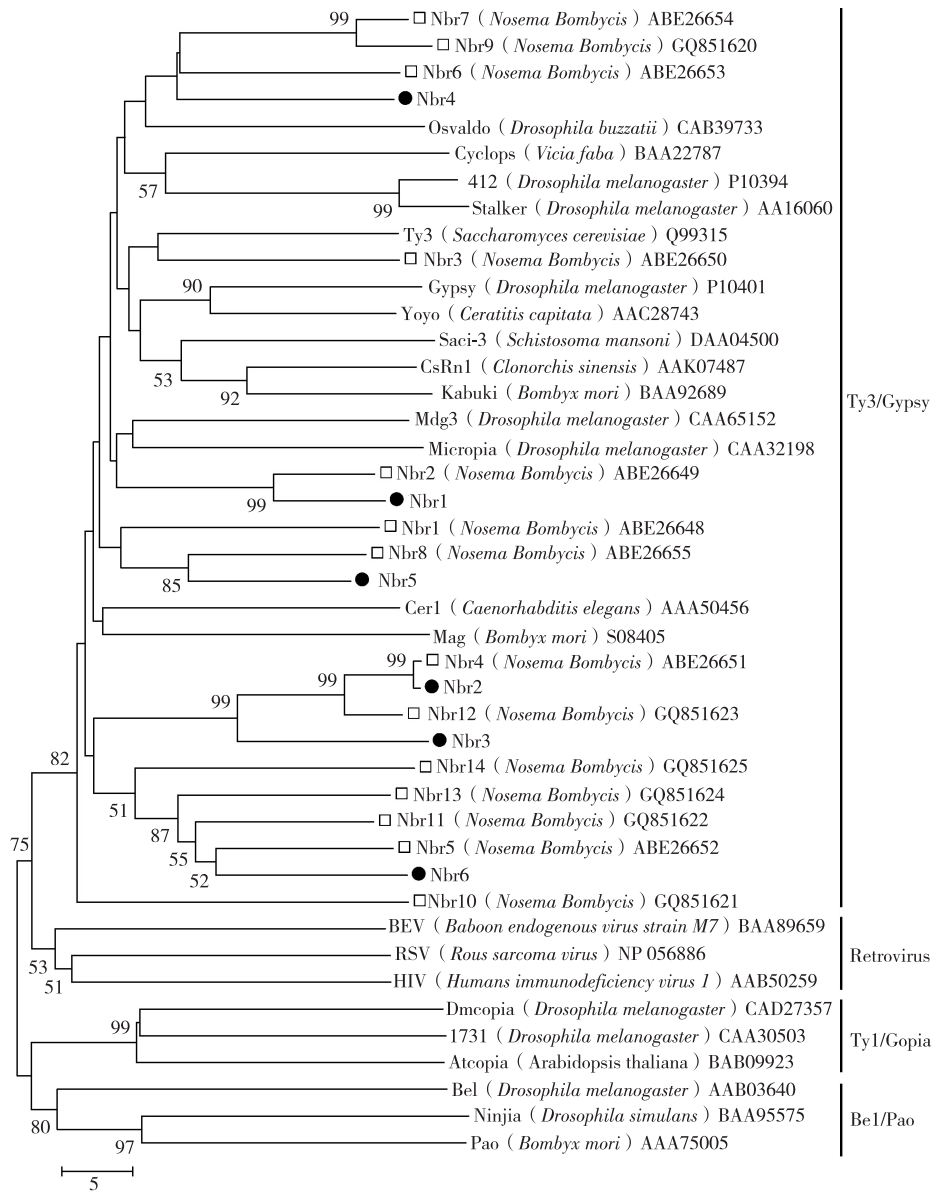
图 2 柞蚕微孢子虫 LTR 反转座子多重序列比对

Fig. 2 The presentation of multiple alignments for *N. pernyi* LTR retrotransposons

反转座子虽然广泛分布于微孢子虫基因组中,但被验证的具有活性的反转座子报道不多。在家蚕微孢子虫基因组中鉴定到了 7 个有活性的 LTR 反转座子家族,分别为 Nbr5, Nbr9, Nbr10, Nbr11, Nbr12, Nbr13 和

Nbr14^[30],这些家族中反转座子聚合酶基因存在结构域缺失或者插入冗余序列的情况。对于反转座子家族中结构域缺失但仍保留活性的现象,有学者提出,LTR 反转座子家族中各成员的结构域在功能上具有互补性^[31]。在柞蚕微孢子虫 LTR 反转座子中,不同家族间呈现结构多样性,某些家族缺失部分功能结构域,但 RT 结构域、RH 结构域和 Pro 结构仍存在保守基序。本研究推测柞蚕微孢子虫部分 LTR 反转座子家族 ORF 结构的缺失并不会导致活性完全丧失。系统进化树则显示柞蚕微孢子虫中 LTR 反转座子 Nar6 家族与家蚕微孢子虫有转录活性的 Nbr5, Nbr11, Nbr12, Nbr13 和 Nbr14 家族聚为一支,这暗示 Nar6 可能具有转录活性,但柞蚕微孢子虫 LTR 反转座子家族是否还具有转座活性有待进一步研究。

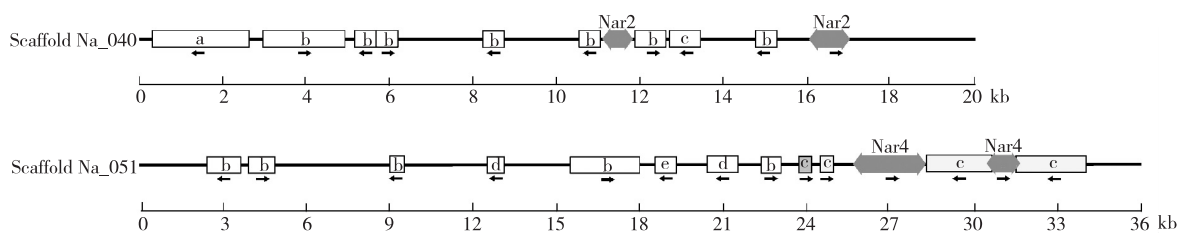
此外,Nar2 和 Nar4 家族在柞蚕基因组中成串分布,并且与其他转座子成簇聚集,与前人报道的微孢子虫反转座子在基因组内具有特定排布方式相一致。如家蚕微孢子虫 LTR 反转座子通常与其他转座元件聚集并插入到两个共线性区域^[19,21]。柞蚕微孢子虫 LTR 反转座子相对集中的分布方式,减轻了对整个基因组产生突变的危害^[28-29]。



注:圆圈表示柞蚕微孢子虫 LTR 反转座子家族,空心方框表示家蚕微孢子虫已确定的 LTR 反转座子家族,括号内为物种拉丁学名,括号后方为 GenBank 登录号

图 3 柞蚕微孢子虫和其他物种基于 LTR 反转座元件中 RT 结构域序列的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of the Nar retrotransposons and homologues in other species based on their reverse transcriptase sequences



注:方框中的字母 a~e 分别表示几丁质合成酶、假设蛋白、其他 Nar 家族、无特征蛋白和转座酶

图 4 LTR 反转座子在柞蚕微孢子虫基因组中的分布

Fig. 4 Distribution of LTR element in *N. pernyi* genomic

参考文献:

- [1] SMIT A F. Interspersed repeats and other mementos of transposable elements in mammalian genomes[J]. *Current Opinion in Genetics & Development*, 1999, 9(6): 657-663.
- [2] SANMIGUEL P, TIKHONOV A, JIN Y K, et al. Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome[J]. *Science*, 1996, 274(5288): 765-768.
- [3] POULTER R T M, GOODWIN T J D. DIRS-1 and the other tyrosine recombinase retrotransposons[J]. *Cytogenetic and Genome Research*, 2005, 110(1/2/3/4): 575-588.
- [4] KUMAR A, BENNETZEN J L. Plant retrotransposons[J]. *Annual Review of Genetics*, 1999, 33: 479-532.
- [5] KIDWELL M G, LISCH D R. Transposable elements and host genome evolution[J]. *Trends in Ecology and Evolution*, 2000, 15(3): 95-99.
- [6] GANKO E W. Evolutionary history of Cer elements and their impact on the *C. elegans* genome[J]. *Genome Research*, 2001, 11(12): 2066-2074.
- [7] GAO L, Mc CARTHY E M, GANKO E W, et al. Evolutionary history of *Oryza sativa* LTR retrotransposons: a preliminary survey of the rice genome sequences[J]. *BMC Genomics*, 2004, 5(1): 18.
- [8] 秦利. 中国柞蚕学[M]. 北京: 中国科学文化出版社, 2003: 347-352.
- QIN L. Chinese tussah[M]. Beijing: China Science and Culture Press, 2003: 347-352.
- [9] 王勇. 柞蚕微孢子虫 EST 分析、孢壁蛋白 *NpSWP1* 基因克隆及柞蚕免疫应答研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2014.
- WANG Y. EST analysis of *Nosema pernyi*, *NpSWP1* gene cloning and immune response in *Antheraea pernyi* [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2014.
- [10] VOSSBRINCK C R, MADDOX J V, FRIEDMAN S, et al. Ribosomal RNA sequence suggests microsporidia are extremely ancient eukaryotes[J]. *Nature*, 1987, 326(6111): 411-414.
- [11] KEELING P J, LUKER M A, PALMER J D. Evidence from Beta-tubulin phylogeny that microsporidia evolved from within the fungi[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2000, 17(1): 23-31.
- [12] HIRT R P, LOGSDON J M Jr, HEALY B, et al. Microsporidia are related to fungi: evidence from the largest subunit of RNA polymerase II and other proteins[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(2): 580-585.
- [13] HIRT R P, HEALY B, VOSSBRINCK C R, et al. A mitochondrial Hsp70 orthologue in *Vairimorpha necatrix*: molecular evidence that microsporidia once contained mitochondria[J]. *Current Biology*, 1997, 7(12): 995-998.
- [14] 周泽扬. 家蚕微孢子虫基因组生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2014.
- ZHOU Z Y. Genome biology of *Nosema bombycis* [M]. Beijing: Science Press, 2014.
- [15] GOODWIN T J D, POULTER R T M. The diversity of retrotransposons in the yeast *Cryptococcus neoformans* [J]. *Yeast*, 2001, 18(9): 865-880.
- [16] GOODWIN T J D. Multiple LTR-retrotransposon families in the asexual yeast *Candida albicans* [J]. *Genome Research*, 2000, 10(2): 174-191.
- [17] 苗琦. Tca4 和 Zorro2 的转座激活与白念珠菌适应性形成的相关性研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2013.
- MIAO Q. Study between the transposition of Tca4 and Zorro2 with the adaptability formation of *Candida albicans* [D]. Shanghai: Second Military Medical University, 2013.
- [18] XU J S, PAN G Q, FANG L, et al. The varying microsporidian genome: existence of long-terminal repeat retrotransposon in domesticated silkworm parasite *Nosema bombycis* [J]. *International Journal for Parasitology*, 2006, 36(9): 1049-1056.
- [19] XIANG H, PAN G Q, ZHANG R Z, et al. Natural selection maintains the transcribed LTR retrotransposons in *Nosema bombycis* [J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2010, 37(5): 305-314.
- [20] PAN G Q, XU J S, LI T, et al. Comparative genomics of parasitic silkworm microsporidia reveal an association between genome expansion and host adaptation[J]. *Bmc Genomics*, 2013, 14(1): 186-186.
- [21] 刘兰兰, 吴春漫, 张小燕, 等. 家蚕微孢子虫和柞蚕微孢子虫 LINE 类反转录转座子 R4 的鉴定及系统进化分析[J]. *蚕业科学*, 2014, 40(4): 681-687.
- LIU L L, WU C M, ZHANG X Y, et al. Identification and phylogenetic analysis of LINE retrotransposons R4 in *Nosema bombycis* and *Nosema pernyi* [J]. *Sericultural Science*, 2014, 40(4): 681-687.
- [22] LEE H, LEE M, ISMAIL W M, et al. MGEScan: a galaxy-based system for identifying retrotransposons in genomes [J]. *Bioinformatics*, 2016, 32(16): 2502-2504.
- [23] BOWEN N J, Mc DONALD J F. *Drosophila* euchromatic LTR retrotransposons are much younger than the host species in which they reside[J]. *Genome research*, 2001, 11(9): 1527-1540.
- [24] CHEN N. Using repeat masker to identify repetitive elements in genomic sequences [J]. *Current Protocols in*

- Bioinformatics, 2004, 5(1): 4-10.
- [25] BODZIOCH M, LAPICKA-BODZIOCH K, ZAPALA B, et al. Evidence for potential functionality of nuclearly-encoded humanin isoforms[J]. Genomics, 2009, 94(4): 247-256.
- [26] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [27] WICKER T, SABOT F, HUA-VAN A, et al. A unified classification system for eukaryotic transposable elements [J]. Nature Reviews Genetics, 2007, 8(12): 973-982.
- [28] PEREIRA V. Insertion bias and purifying selection of retrotransposons in the *Arabidopsis thaliana* genome [J]. Genome Biology, 2004, 5(10): R79.
- [29] BARTOLOME C, MASIDE X, CHARLESWORTH B. On the abundance and distribution of transposable elements in the genome of *Drosophila melanogaster* [J]. Molecular Biology and Evolution, 2002, 19(6): 926-937.
- [30] 张瑞芝. 家蚕微孢子虫 LTR 反转座子的活性研究[D]. 重庆: 西南大学, 2008.
ZHANG R Z. Characterization of active LTR retrotransposons in *Nosema bombycis* [D]. Chongqing: Southwest University, 2008.
- [31] SABOT F, SCHULMAN A H. Parasitism and the retrotransposon life cycle in plants: a hitchhiker's guide to the genome [J]. Heredity, 2006, 97(6): 381.

Animal Sciences

Identification and Phylogenetic Analysis of LTR Retrotransposons in *Nosema pernyi*

ZHOU Jun, SHI Peng, ZHANG Shuang, XU Jinshan, ZHANG Xiaoyan

(Chongqing key Laboratory of Vector Insects, Chongqing Key Laboratory of Animal Biology, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract: [Purposes] To identify the species, quantity and genetic relationship of the LTR inverted locus in the genome of *Nosema pernyi*. [Methods] The genomic sequence of *N. pernyi* was downloaded from the GenBank database, and screened to identify the potential LTR retrotransposons based on MGEScan software. Sequence alignment between potential LTR retrotransposons and reverse transcriptase were performed through NCBI-blast software. Those elements containing the reverse transcriptase domain were considered as the LTR retrotransposons. The structural character, classification type and genomic distribution of these LTR retrotransposons were further explored. [Findings] A total of 6 LTR retrotransposons families were found in the *N. pernyi* genome, ranging in length from 3kb to 4kb. Most families have similar LTR terminal nucleotides, but show the sequence difference about target site duplication and copy number. The phylogenetic tree of the RT domain shows that all the Nars belongs to the Ty3/Gypsy type and forms a sister branch with the *Nosema bombycis* LTR retrotransposons. The copies of Nar4 family and Nar2 family were arranged in tandem on the genome with similar distribution characteristics. [Conclusions] The *N. pernyi* genome has several complete Gypsy-type LTR retransposon, which show the closely evolutionary relationship to the elements from the *N. bombycis*. The copies of Nars were arranged in a cluster on the genome and may be one of the potential factors for the expansion of the *N. pernyi* genome.

Keywords: LTR retrotransposons; *Nosema pernyi*; genome; phylogenetic

(责任编辑 方 兴)

10种昆虫过氧化氢酶基因的全基因组鉴定与特征预测*

张莉娟, 尹华春, 李 勃, 陈 斌

(重庆师范大学 生命科学学院 昆虫与分子生物学研究所 媒介昆虫重庆市重点实验室, 重庆 401331)

摘要:【目的】在全基因组水平上鉴定10种具有代表性昆虫的过氧化氢酶(CAT)基因,并对鉴定所得CAT基因的基本特征和系统发育关系分别进行预测和分析。【方法】在NCBI数据库中下载CAT氨基酸序列作为询问序列,通过本地Blast方法在10种昆虫全基因组水平搜索和鉴定CAT基因并命名。通过生物信息学方法预测10种昆虫CAT家族基因的特征、氨基酸同源序列一致率、保守结构域等。通过MEGA-X软件用最大似然法推断10种昆虫的CAT基因的系统发育。【结果】共鉴定得到23个CAT基因,内华达古白蚁(*Zootermopsis nevadensis*)、东亚飞蝗(*Locusta migratoria*)、人虱(*Pediculus humanus*)、苜蓿蓟马(*Frankliniella occidentalis*)、茶翅蝽(*Halymorpha halys*)、赤拟谷盗(*Tribolium castaneum*)、黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)、冈比亚按蚊(*Anopheles gambiae*)、家蚕(*Bombyx mori*)和意大利蜜蜂(*Apis mellifera*)基因组上分别有3,1,1,1,4,3,2,1,6和1个CAT基因,均具有全长的转录组序列,编码406~553个氨基酸,氨基酸分子量为46.0~63.7 kDa,等电点为5.21~9.19。鉴定得到的CAT基因共有122个外显子,99个内含子,且外显子与内含子分布模式在物种间差异较大而种内的CAT基因结构相似。有7个CAT基因编码有信号肽,信号肽包含17~22个氨基酸残基。所有CAT基因编码的氨基酸序列的N端具有1个由17个氨基酸组成的CAT近端活性区域,而C端由9个氨基酸组成的CAT血红素配体区域所组成;其中家蚕的*BmCat2*基因中单独含有1个细菌胞外溶质结合区域。10种昆虫的CAT1基因具有1:1的直系同源关系,家蚕出现特异性扩增独立形成支系,与CAT1支系互为姐妹群。【结论】研究结果提供了10个代表性昆虫CAT基因的基础信息,为进一步开展该基因的功能研究奠定了基础。

关键词:昆虫;过氧化氢酶;全基因组鉴定;特征;系统发育

中图分类号:Q966

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2019)03-0036-08

生物体在逆境胁迫条件下应激产生丰富的活性氧(Reactive oxygen species, ROS),如超氧阴离子自由基、单线态氧、过氧化氢、羟自由基等。ROS在昆虫的先天免疫系统中具有极为重要的作用^[1],它的动态平衡能够激活信号转导^[2]、调控细胞增长和凋亡^[3-4]等不同生理过程,但过量的ROS累积会破坏细胞结构和功能,严重损伤机体内的DNA、蛋白质等大分子物质。

过氧化氢酶(CAT)、超氧化歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)等3种抗氧化酶广泛分布于生物体内,由它们组成的保护酶系统可以清除生物体内过剩的ROS,保护生物体免受环境胁迫的危害^[5]。当ROS大量生产时,SOD也被大量诱导生成,催化ROS发生歧化反应生成水和过氧化氢,这是抗氧化作用的第一道防线^[6]。过氧化氢的不断累积会诱导CAT和POD基因表达上升,由此产生大量的CAT和POD以过氧化氢为底物并将它分解为对机体无害的水和氧气,最终消除超量ROS对生物体产生的氧化损伤,反应式为 $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$ ^[7]。

Thenard于1881年发现CAT,之后Loew于1901年对该酶予以正式命名^[8]。迄今为止,有关酵母(*Aspergillus oryzae*)^[9]、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)^[10]、小鼠(*Mus musculus*)^[11]、智人(*Homo sapiens*)^[12]等生物的CAT基因的研究已有不少。在昆虫方面,Orr等人^[13]于1990年首先克隆了黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)的CAT基因,为昆虫CAT基因研究的奠定了基础。此后对不同昆虫CAT基因的研究工作逐渐展开,例如在家蚕(*Bombyx mori*)^[14]、葱蝇(*Delia antiqua*)^[15]、意大利蜜蜂(*Apis mellifera*)^[16]、冈比亚按蚊(*Anopheles gambiae*)^[17]、异色瓢虫(*Harmonia axyridis*)^[18]等昆虫的CAT基因的功能和系统发育关系方面已有大量的研

* 收稿日期:2018-11-12 修回日期:2019-03-18 网络出版时间:2019-05-09 19:30

资助项目:“两江学者”计划专项经费;国家自然科学基金(No. 31672363;No. 31372265);国际原子能机构DRP项目(No. 18268);国家科技基础性工作专项重点项目(No. 2015FY210300)

第一作者简介:张莉娟,女,研究方向为生物化学与分子生物学,E-mail:437619634@qq.com;通信作者:陈斌,男,教授,博士生导师,E-mail:bin.chen@cqnu.edu.cn

网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20190509.1930.038.html

究。鉴于 CAT 在昆虫的抗氧化作用中起到重要作用,是影响昆虫生长发育和生殖的一大主要因素,因此本研究在农林害虫、媒介医学昆虫以及经济昆虫中一共选出 10 种代表性昆虫作为研究对象,基于 NCBI 开放数据,利用生物信息学分析方法对它们的 CAT 基因家族在全基因组水平上进行了鉴定并进行命名。然后,对这些 CAT 基因编码的氨基酸序列的相似值和保守性、基因的结构、系统发育等方面进行了研究和分析,以便为进一步开拓昆虫中 CAT 功能的研究提供信息基础。

1 材料与方法

1.1 数据来源

10 种昆虫的基因组数据均源自 NCBI 的 GeneBank 数据库,它们的学名、隶属目名、种名缩写及组装 ID 号信息如表 1 所示。

表 1 10 种昆虫的基因组数据来源
Tab. 1 Genomic data sources for ten insect species

物种名	物种所在目名	种名缩写	组装 ID 号
内华达古白蚁(<i>Zootermopsis nevadensis</i>)	蜚蠊目(Blattaria)	Zn	GCF_000696155.1
东亚飞蝗(<i>Locusta migratoria</i>)	直翅目(Orthoptera)	Lm	GCA_000516895.1
人虱(<i>Pediculus humanus</i>)	虱目(Anoplura)	Ph	GCF_000006295.1
苜蓿蓟马(<i>Frankliniella occidentalis</i>)	缨翅目(Thysanoptera)	Fo	GCA_000697945.3
茶翅蝽(<i>Halymorpha halys</i>)	半翅目(Hemiptera)	Hh	GCF_000696795.2
赤拟谷盗(<i>Tribolium castaneum</i>)	鞘翅目(Coleoptera)	Tc	GCF_000002335.3
黑腹果蝇(<i>D. melanogaster</i>)	双翅目(Diptera)	Dm	GCF_000001215.4
冈比亚按蚊(<i>A. gambiae</i>)	双翅目(Diptera)	Ag	GCF_000005575.2
家蚕(<i>B. mori</i>)	鳞翅目(Lepidoptera)	Bm	GCF_000151625.1
意大利蜜蜂(<i>A. mellifera</i>)	膜翅目(Hymenoptera)	Am	GCF_003254395.2

1.2 基因鉴定与命名

为鉴定 10 种昆虫的 CAT 基因,从 NCBI 的 GeneBank 数据库中下载已经被鉴定出来 CAT 氨基酸序列作为本地 BLAST 的询问序列 Query。步骤如下:1) 通过 tBlastn 以已知序列作为 Query 搜索本地基因组数据库,阈值设为 1×10^{-5} ,获得可能的 CAT 基因序列。2) 将相似性大于 30% 的序列连同左右翼侧区(500 bp 或以上)输出,取出的基因组序列输入 Fgenesh+ (<http://www.softberry.com/berry.phtml>) 在线软件中进行基因预测。3) 为验证该序列是否为 CAT 的基因序列,将预测所得基因序列所翻译的氨基酸序列在 GenBank 中再次进行在线比对,将具有 CAT 结构域(Pfm 注释号为 PF00199)的基因作为 CAT 基因。

1.3 基因基本特征分析

用在线软件 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>), TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 和 SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 对 10 种昆虫 CAT 氨基酸序列的分子量、分子式、等电点、亚细胞定位、跨膜区和信号肽进行预测。使用 Bioedit 软件对这些 CAT 氨基酸序列进行多重比对和相似值(Identity)统计,将多重比对的结果通过在线软件 CSIC (<http://molevol.cmima.csic.es/castresana/index.html>) 进行不饱和预测,预测结果导入 GeneDoc 2.7.0 软件预测其保守区域。通过在线软件 GSDS (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) 预测 10 种昆虫的 CAT 基因结构,包括外显子和内含子的大小以及内含子的相位。通过 CorelDraw 8.0 绘制有关示意图。

1.4 基因系统发育关系

经过在线软件 Gblocks Server (<http://molevol.cmima.csic.es/castresana/index.html>) 计算 10 种昆虫 CAT 氨基酸序列的饱和度,结果导入 MEGA-X 软件计算这些 CAT 氨基酸序列的系统发育模型,基于赤池信息

量准则(Akaike information criterion, AIC)测算出 10 种昆虫的 CAT 氨基酸序列最佳进化模型为 LG+G。使用 MEGA-X^[19] 和 PHYML^[20] 在线网站(<http://www.atgc-montpellier.fr/>)基于这些昆虫的 CAT 氨基酸序列使用最大似然法(Maximum likelihood, ML)构建系统发育关系,进行 1 000 次重复计算,记录各分支 bootstrap 值,推断这些昆虫的系统发育关系。

2 结果

2.1 CAT 基因鉴定情况及所编码蛋白质的理化特性

基于 10 种代表性昆虫全基因组水平上的搜索与鉴定,共获得 23 个 CAT 基因。内华达古白蚁、东亚飞蝗、人虱、苜蓿蓟马、茶翅蝽、赤拟谷盗、黑腹果蝇、冈比亚按蚊、家蚕和意大利蜜蜂 10 个物种分别有 3,1,1,1,4,3,2,1,6 和 1 个 CAT 基因,其中隶属鳞翅目的家蚕 CAT 基因中出现了特异性扩增的现象。根据它们 Catalase 结构域信息及其在基因组上的位置,分别将上述物种的 CAT 基因命名,如表 2 所示。

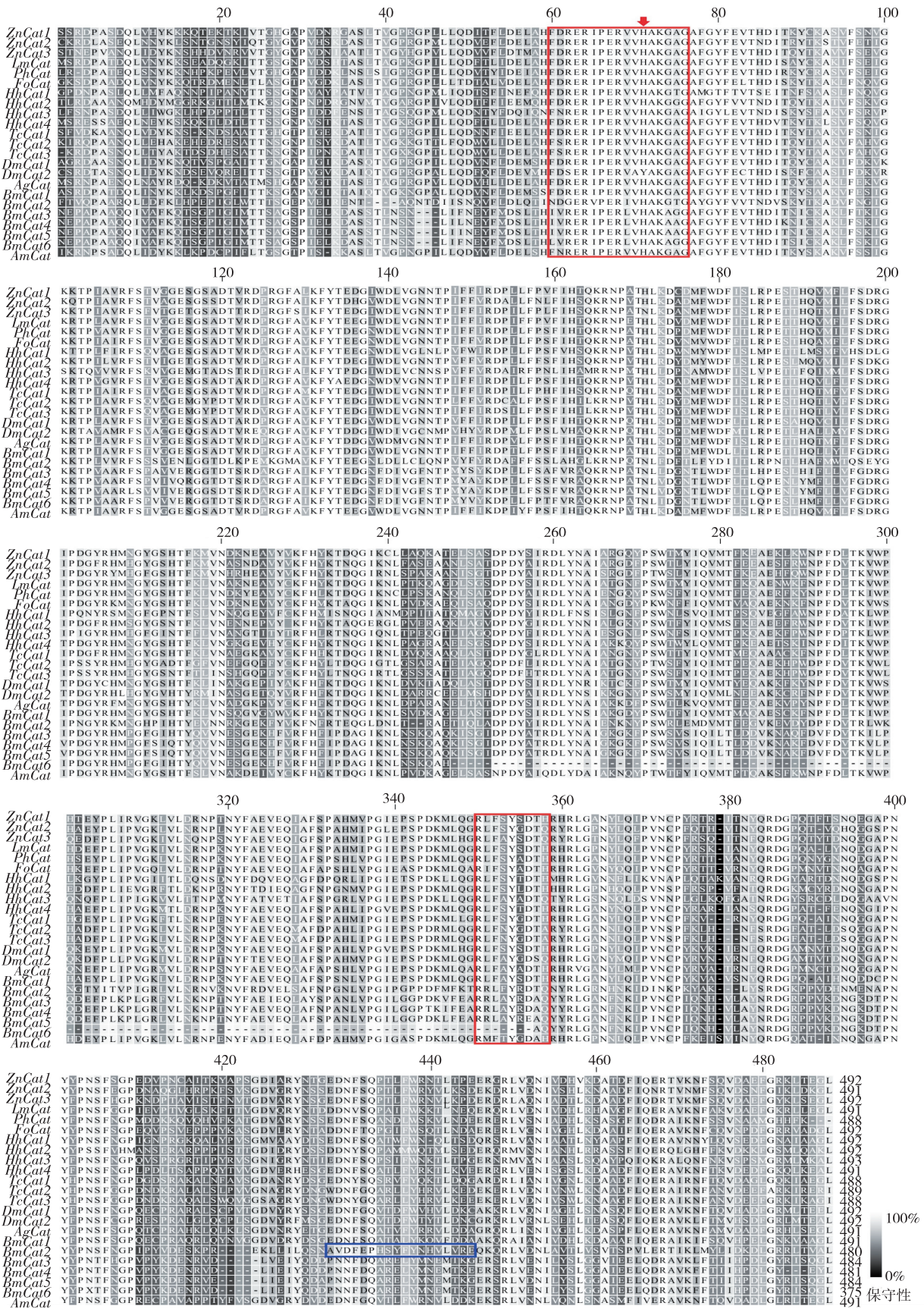
表 2 10 种代表性昆虫 CAT 基因及所编码蛋白质特征

Tab. 2 Characteristics of CAT genes and their encoded proteins in 10 representative insects

基因名	基因长度/bp	编码区长度/bp	编码氨基酸数目/个	Scaffold 位置分布	编码蛋白质相对分子质量/kDa	等电点	信号肽在氨基酸序列上的位置
<i>ZnCat1</i>	16 307	1 527	508	NW_019059701.1: 391 315~407 621	57.9	8.53	
<i>ZnCat2</i>	8 191	1 548	515	NW_019060838.1: 70 545~78 735	58.7	6.50	1~17
<i>ZnCat3</i>	6 073	1 578	525	NW_019060838.1: 62 488~68 560	59.8	5.78	1~20
<i>LmCat</i>	1 524	1 167	507	AVCP_010000197.1: 482~2 007	57.5	7.28	
<i>PhCat</i>	1 615	1 476	491	NW_002987345.1:88 685~90 299	55.9	6.84	
<i>FoCat</i>	11 234	1 563	506	NW_020292229.1: 666 678~ 677 911	57.0	8.41	
<i>HhCat1</i>	26 815	1 557	504	NW_020110941.1:2 978~29 792	56.0	5.21	
<i>HhCat2</i>	53 111	1 625	526	NW_020111069.1: 75 638~128 748	60.4	7.27	1~22
<i>HhCat3</i>	23 796	1 629	542	NW_020110941.1: 32 957~56 752	61.4	9.19	1~20
<i>HhCat4</i>	10 033	1 512	503	NW_020110221.1: 703 064~713 096	56.8	8.68	
<i>TcCat1</i>	9 608	1 506	501	NC_007418.3:11 506 553~11 516 160	56.2	8.21	
<i>TcCat2</i>	3 874	1 551	516	NW_015450233.1:549 758~553 631	58.7	6.23	
<i>TcCat3</i>	3 865	1 539	512	NW_015450233.1: 555 433~559 297	57.9	6.73	
<i>DmCat1</i>	5 113	1 563	506	NT_037436.4:18 822 786~18 827 898	57.1	8.39	
<i>DmCat2</i>	1 584	1 596	506	NT_033779.5:8 705 695~8 707 278	58.0	6.94	
<i>AgCat</i>	8 860	1 557	504	NT_078265.2:5 772 129~5 780 988	56.9	8.40	
<i>BmCat1</i>	2 320	1 566	507	NW_004582015.1:5 278 759~5 281 078	56.9	8.11	
<i>BmCat2</i>	1 949	1 708	553	NW_004582029.1:4 754 147~4 756 095	63.7	8.97	
<i>BmCat3</i>	1 787	1 592	515	NW_004581718.1:151 468~153 254	58.0	7.21	1~17
<i>BmCat4</i>	2 837	1 521	492	NW_004582179.1:10 240~13 076	55.5	8.19	
<i>BmCat5</i>	1 872	1 595	516	NW_004582179.1:23 047~24 918	57.1	8.48	1~17
<i>BmCat6</i>	3 726	1 255	406	NW_004582505.1:4 516~8 241	46.0	7.19	1~17
<i>AmCat</i>	10 555	1 542	513	NC_037643.1:8 659 926~8 670 480	58.0	8.39	

注:基因名中前两个字母代表的物种名见表 1,下同

鉴定所得 CAT 基因均具有蛋白质编码的全长序列,基因长度为 1 524~53 111 bp,编码区长度为 1 167~1 708 bp,编码氨基酸数为 406~553 个;编码蛋白质相对分子质量为 46.0~63.7 kDa,等电点为 5.21~9.19,亚



注:3个方框从上到下依次表示过氧化氢酶近端活性区域、过氧化氢酶血红素配体区域和细菌溶质结合结区域;箭头指向过氧化氢酶活性位点

图 3 10 种代表性昆虫 CAT 氨基酸序列的多重比对及特征

Fig. 3 Multiple sequence alignment and characteristics of amino acid sequences of CAT in ten representative insects

在群 I 中, *HhCat4* 由 *HhCat3* 复制而来, *TcCat3* 由 *TcCat2* 复制而来。在群 II 中, *DmCat* 发生了 1 次基因复制事件。在群 III 中, *ZnCat* 基因中发生了 2 次基因复制事件: *ZnCat3* 由 *ZnCat2* 复制而来, *ZnCat2* 由 *ZnCat1* 复制而来。群 IV 是家蚕经过物种特异性扩增的 CAT 枝系, 推测其中包含的 5 个基因可能是由 *BmCat1* 基因复制而来。群 II 与群 III 互为姐妹群, 其中群 II 中的物种分类隶属于鞘翅目、鳞翅目和双翅目, 它们在分类地位上亲缘关系较近; 群 III 中的物种分类隶属于同翅目、膜翅目、直翅目、缨翅目、虱目和蜚蠊目, 在分化时间上出现较早, 推测它们应该面临比较相似的生活环境或生态位。

3 讨论

CAT 在昆虫的保护酶系统中扮演着重要角色, 能清除昆虫体内过剩的 ROS, 从而保护昆虫免受环境胁迫的危害。本研究在涉及农林学、媒介医学及经济类的 10 种代表性昆虫中共鉴定出 23 个 CAT 基因, 其中东亚飞蝗、人虱、苜蓿蓟马、冈比亚按蚊及意大利蜜蜂只含有 1 条 CAT 基因, 内华达古白蚁、茶翅蝽、赤拟谷盗和黑腹果蝇含有 2~4 个 CAT 基因, 而家蚕 CAT 基因存在特异性扩增现象, 因而数目达到 6 个。推测 CAT 基因的扩增可能与昆虫适应自身生活的环境有关^[17,21]。

10 种昆虫 CAT 基因编码的蛋白质相对分子质量介于 46.0~63.7 kDa 之间, 均含有 Catalase, Catalase-rel 结构域各 1 个, 且均不含跨膜域。 *ZnCat2*, *ZnCat3*, *HhCat2*, *HhCat3*, *BmCat3*, *BmCat5* 和 *BmCat6* 共 7 个基因具有信号肽, 信号肽包含 17~22 个氨基酸残基。CAT 是一种稳定性无信号肽的蛋白, 属于非分泌性蛋白^[22], 推测内华达古白蚁、茶翅蝽和家蚕中出现具有信号肽的 CAT 基因可能是它们在环境中受到的氧化应激更多, 为适应环境, 在基因复制过程中融合编码分泌蛋白的信号肽, 以保护体内各组织免受氧化应激反应^[23]。

本研究还分析了 10 个代表性昆虫物种 CAT 基因的系统发育关系, 可以看到 10 种昆虫的 CAT1 基因具有 1:1 的直系同源关系, 物种特异性扩增的家蚕 CAT 基因 (*BmCat2*, *BmCat3*, *BmCat4*, *BmCat5* 和 *BmCat6*) 组成的群 IV 与 10 种昆虫的 CAT1 基因支系群 II 和群 III 为姐妹群关系。其中, 具有特异性扩增的家蚕 CAT 基因中, 具有信号肽序列的 *BmCat3*, *BmCat5*, *BmCat6* 基因和具有细菌的分泌性 CAT 基因 *BmCat2* 没有聚集在一个进化枝上, 因此可以确定含有信号肽序列的家蚕 CAT 基因并不是在测序过程中混入的细菌基因, 推测在 *BmCat2* 中发生了基因的水平转移。此外, *BmCat2*, *BmCat3*, *BmCat4*, *BmCat5*, *BmCat6*, *TcCat2* 和 *TcCat3* 基因中缺失 CAT 血红素配体区域, 这可能是在 CAT 基因复制过程中, CAT 血红素配体区域随之缺失所致, 或许与昆虫特殊环境的适应相关。而意大利蜜蜂与家蚕 CAT 基因数目的差异可能反映了群居物种和独居物种在生活史和生态位上的差异^[16]。

先前的研究表明, CAT 基因在昆虫不同发育阶段和不同组织中都具有较大的差异化表达。如甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua*) CAT 基因的成虫期表达量最高达卵期表达量的 7 倍, 幼虫期表达量次之, 卵期表达量最低; 而在组织上, CAT 基因在 5 龄幼虫体壁、中肠、脂肪体和马氏管组织中都有表达, 其中脂肪体中表达量最高^[24]。白蜡窄吉丁 (*Agrilus planipennis*) CAT 基因在幼虫中肠有着较高表达量; 而在不同发育阶段上, 幼虫和预蛹期有着高表达量, 成虫时期表达量下降^[25]。冈比亚按蚊吸血后, 通过 RNAi 干扰技术沉默 CAT 基因, 成活率明显下降^[17]。上述研究揭示了 CAT 基因在昆虫的生长发育和繁殖等方面都发挥着重要作用。

综上所述, 本研究运用生物信息学方法鉴定了涉及农林学、媒介医学及经济类的 10 种代表性昆虫的 CAT 基因, 并进行了命名, 对基因序列的相似性和保守性、基因的结构、系统发育等方面进行了研究和分析。研究结

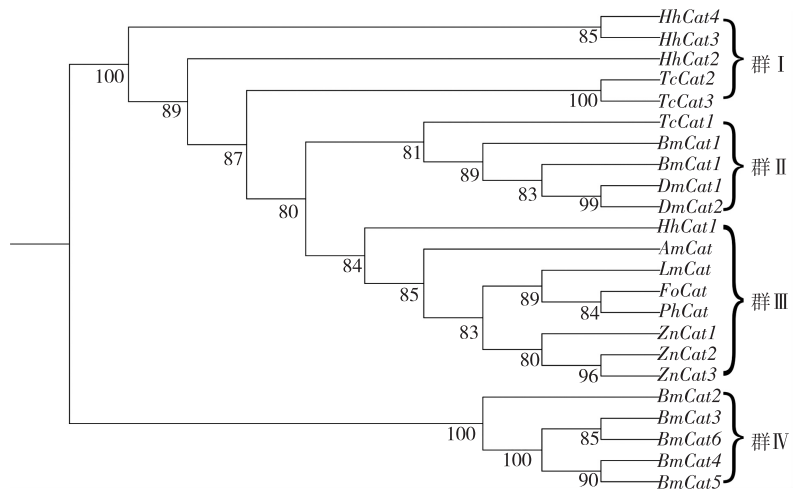


图 4 10 种代表性昆虫基于氨基酸序列的 CAT 基因的系统发育关系

Fig. 4 Phylogenetic relationships of the CAT gene in ten representative insects based on the amino acid sequences

果对进一步研究昆虫的 CAT 基因及相关免疫防御功能奠定了基础。

参考文献:

- [1] BABIOR B M. Phagocytes and oxidative stress[J]. American Journal of Medicine, 2000, 109(1): 33-44.
- [2] RAY P D, HUANG B W, TSUJI Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling [J]. Cellular Signalling, 2012, 24(5): 981-990.
- [3] STEFFENS B, STEFFEN-HEINS A, SAUTER M. Reactive oxygen species mediate growth and death in submerged plants [J]. Frontiers in Plant Science, 2013, 4(2): 179.
- [4] SIMON H U, HAJ-YEHIA A, LEVI-SCHAFFER F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction [J]. Apoptosis, 2000, 5(5): 415-418.
- [5] SCHRADER M, FAHIMI H D. Peroxisomes and oxidative stress[J]. BBA-Molecular Cell Research, 2006, 1763(12): 1755-1766.
- [6] CORONA M, ROBINSON G E. Genes of the antioxidant system of the honey bee: annotation and phylogeny[J]. Insect Molecular Biology, 2010, 15(5): 687-701.
- [7] ZAMOCKY M, FURTMÜLLER P G, OBINGER C. Evolution of catalases from bacteria to humans[J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2008, 10(9): 1527-1548.
- [8] 刘冰, 梁婵娟. 生物过氧化氢酶研究进展[J]. 中国农学通报, 2005, 21(5): 223-224.
LIU B, LIANG C J. Recent advances of catalase in organism[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2005, 21(5): 223-224.
- [9] HISADA H, HATA Y, KAWATO A, et al. Cloning and expression analysis of two catalase genes from *Aspergillus oryzae*[J]. Journal of Bioscience & Bioengineering, 2005, 99(6): 562-568.
- [10] DU Y Y, WANG P C, CHEN J, et al. Comprehensive functional analysis of the catalase gene family in *Arabidopsis thaliana* [J]. Journal of Integrative Plant Biology 2008, 50(10): 1318-1326.
- [11] SCHISLER N J, SINGH S M. A quantitative genetic analysis of tissue-specific catalase activity in *Mus musculus* [J]. Biochemical Genetics, 1991, 29(1/2): 65.
- [12] QUAN F, KORNELUK R G, TROPAK M B, et al. Isolation and characterization of the human catalase gene[J]. Nucleic Acids Research, 1986, 14(13): 5321-5335.
- [13] ORR E C, BEWLEY G C, ORR W C. cDNA and deduced amino acid sequence of *Drosophila* catalase[J]. Nucleic Acids Research, 1990, 18(12): 3663.
- [14] YAMAMOTO K, BANNO Y, FUJII H, et al. Catalase from the silkworm, *Bombyx mori*: gene sequence, distribution, and overexpression[J]. Insect Biochemistry & Molecular Biology, 2005, 35(4): 277-283.
- [15] 胡甘雨, 司风玲, 车燕飞, 等. 葱蝇过氧化氢酶基因的克隆及生物信息学分析[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2014, 36(1): 32-40.
HU G Y, SI F L, CHE Y F, et al. Cloning and bioinformatic analysis of catalase from onion maggot, *Delia antiqua* [J]. Journal of Southwest University (Natural Science Edition), 2014, 36(1): 32-40.
- [16] WEIRICH G F, COLLINS A M, WILLIAMS V P. Antioxidant enzymes in the honey bee, *Apis mellifera* [J]. Apidologie, 2002, 33(1): 3-14.
- [17] DEJONG R J, MILLER L M, MOLINACRUZ A. Reactive oxygen species detoxification by catalase is a major determinant of fecundity in the mosquito *Anopheles gambiae* [J]. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 2007, 104(7): 2122-2126.
- [18] 唐斌, 施佐堃, 郭红双, 等. 异色瓢虫过氧化氢酶(Catalase)的基因克隆及序列分析[J]. 应用昆虫学报, 2014, 51(1): 26-34.
TANG B, SHI Z K, GUO H S, et al. Cloning and sequence analysis of the *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellinae) catalase gene[J]. Chinese Journal of Applied Entomology, 2014, 51(1): 26-34.
- [19] KUMAR S, STECHER G, LI M, et al. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. Molecular Biology & Evolution, 2018, 35(6): 1547-1549.
- [20] STÉPHANE G, FRANCK L, PATRICE D, et al. PHYML Online: a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference[J]. Nucleic Acids Research, 2005, 33: W557-W559.
- [21] WATERHOUSE R M, KRIVENTSEVA E V, MEISTER S, et al. Evolutionary dynamics of immune-related genes and pathways in disease-vector mosquitoes [J]. Science, 2007, 316 (5832): 1738-1743.
- [22] 董书伟, 高昭辉, 申小云, 等. 纳米铜对大鼠肝脏毒性相关蛋白过氧化氢酶的分离鉴定及生物信息学分析[J]. 中国农业科学, 2012, 45(14): 2981-2990.
DONG S W, GAO Z H, SHEN X Y, et al. Isolation, identification and bioinformatics analysis of CAT protein related with hepatotoxicity by copper nanoparticles in rats [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2012, 45(14): 2981-2990.
- [23] 时桂芹. 家蚕抗氧化基因注释及功能研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2013.
SHI G Q. Annotation and study on the function of antioxidant genes in silkworm, *Bombyx mori* [D]. Chongqing: Chongqing University, 2013.

[24] 胡振,左洪亮,李亚楠,等. 甜菜夜蛾过氧化氢酶 cDNA 序列克隆、序列分析和表达特征[J]. 昆虫学报, 2011, 54(11): 1249-1257.
HU Z, ZUO H L, LI Y N, et al. Cloning, sequence analysis and expression profiling of cDNA coding for catalase from the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Lepidoptera;

Noctuidae)[J]. Acta Entomologica Sinica, 2011, 54(11): 1249-1257.

[25] RAJARAPU S P, MAMIDALA P, HERMS D A, et al. Antioxidant genes of the emerald ash borer (*Agrilus planipennis*): gene characterization and expression profiles [J]. Journal of Insect Physiology, 2011, 57(6): 819-824.

Animal Sciences

Genome-Wide Identification and Prediction of Characteristics on Catalase Genes in Ten Insect Species

ZHANG Lijuan, YIN Huachun, LI Bo, CHEN Bin

(Chongqing Key Laboratory of Vector Insects, Institute of Entomology and Molecular Biology, College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract: [Purposes] The catalase genes of 10 representative insects were identified at the genome-wide level, and the basic characteristics and phylogenetic relationships of *CAT* genes identified were predicted and analyzed respectively. [Methods] The *CAT* amino acid sequences were downloaded from NCBI database as query sequences, and the *CAT* genes were searched and identified at the genome-wide level of 10 insects by local blast method. The bioinformatics methods were used to predict the characteristics, the consistency of amino acid homologous sequence and conserved domains of *CAT* family genes of 10 insect species. The phylogeny of *CAT* genes in 10 insect species was inferred by maximum likelihood method with MEGA-X software. [Findings] A total of 23 *CAT* genes were identified, the genomes of *Zootermopsis nevadensis*, *Locusta migratoria*, *Pediculus humanus*, *Frankliniella occidentalis*, *Halyomorpha halys*, *Tribolium castaneum*, *Drosophila melanogaster*, *Anopheles gambiae*, *Bombyx mori* and *Apis mellifera* have 3, 1, 1, 1, 4, 3, 2, 1, 6, and 1 *CAT* genes, respectively, all of which have full-length transcriptional sequence encoding 406~553 amino acids, with the molecular weight of 46.0~63.7 kDa and isoelectric point of 5.21~9.19. The identified *CAT* gene contain 122 exons and 99 introns, and the distribution patterns of exons and introns were significantly different among species, while the *CAT* gene structure within species was similar. Seven *CAT* genes have signal peptides containing 17~22 amino acid residues. The N-terminal of the amino acid sequence encoded by *CAT* genes has an *CAT* active domain composed of 17 amino acids, while the C-terminal is composed of a *CAT* heme-ligand domain composed of 9 amino acids and the *BmCat2* gene of *B. mori* contains a bacterial extracellular solute binding domain. *CAT1* gene of 10 insects have 1:1 orthologous relationship, and the *B. mori* shows specific expansion to form a branch independently, which is a sister group with the *CAT1* branch. [Conclusions] The results provide the basic information of *CAT* genes in 10 representative insect, and lay a foundation for further study on the function of this gene.

Keywords: insect; catalase; genome-wide identification; characteristics; phylogeny

(责任编辑 方 兴)

基于微卫星标记的中华蜜蜂5个自然群体遗传多样性分析*

张爽, 周俊, 胡冲, 吕言, 石鹏, 许金山

(重庆师范大学 重庆市媒介昆虫重点实验室 重庆市动物生物学重点实验室, 重庆 401331)

摘要:【目的】分析中国四川阿坝、黄土高原、海南岛、浙闽丘陵、滇南地区等地的中华蜜蜂(*Apis cerana cerana*)自然群体遗传多样性。【方法】提取样品基因组DNA后进行PCR扩增,并用聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。通过计算15对微卫星标记在5个中华蜜蜂自然群体中的等位基因数、多态信息含量、期望杂合度、观测杂合度、遗传距离、遗传相似系数和遗传分化系数,进而评估各中华蜜蜂种群遗传多样性和各种群间遗传分化。【结果】15个微卫星位点共检测到64个等位基因,每个位点的等位基因数平均为4.2667个,单个位点的等位基因数为2~6个。各群体平均等位基因数为2.6~3.0667个,平均观测杂合度为0.5503~0.6643,平均期望杂合度为0.5244~0.5667,平均多态信息量为0.4103~0.4927。四川阿坝群体与黄土高原、海南岛、浙闽丘陵、滇南地区等地群体在Acc001, Acc096, Acc131等3个位点上存在明显分化;黄土高原群体与海南岛、浙闽丘陵、滇南地区等地群体在Acc114, Acc121, Acc132等3个位点上表现出一定程度的遗传分化;海南岛群体与浙闽丘陵、滇南地区两地群体在Acc001, Acc002, Acc004, Acc131, Acc132等5个位点上均表现出较强的遗传分化;浙闽丘陵与滇南地区群体间在Acc002, Acc121, Acc131等3个位点上遗传分化极明显。5个中华蜜蜂自然群体之间的遗传距离在0.1601~0.4910之间。【结论】5个中华蜜蜂群体遗传多样性丰富,群体间遗传分化明显。

关键词:微卫星标记;中华蜜蜂;自然种群;遗传多样性

中图分类号:Q175

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2019)03-0044-07

中华蜜蜂(*Apis cerana cerana*),属于东方蜜蜂(*Apis cerana*)的亚种,在中国通常被称为“土蜂”,是中国特有蜜蜂种质资源。中国地域范围广,地貌差异大,中华蜜蜂经过长期的适应,形成了多种生态型,遗传多样性十分丰富,现已被中国畜禽种质资源委员会设为种质资源保护对象。在加强对中华蜜蜂种质资源保护的各项工作中,有关中华蜜蜂群体资源遗传特性的研究有着十分重要的意义。

微卫星(Microsatellite)是广泛分布于真核生物基因组中的一种简单重复序列(Simple sequence repeat, SSR),一般由2~6个核苷酸重复片段组成。由于个体间串联重复单元的重复次数呈现高度变异性且在基因组中数量丰富,因此微卫星标记广泛应用于生物的系统发育、遗传结构、遗传多样性和保护生物学等研究领域^[1]。近10余年来,众多研究者开始尝试用微卫星标记开展蜜蜂种群遗传特征、遗传分化、遗传多样性等问题的研究^[2-5]。特别地,已有研究者借鉴意大利蜜蜂(*Apis mellifera*)分子标记来研究中国的中华蜜蜂种群遗传分化,明确了长白山^[6]、福建^[7]、武夷山^[8]、皖南山区与皖西大别山区^[9]的中华蜜蜂遗传分化。Takahashi等人^[10]首先利用了微卫星标记研究了日本的东方蜜蜂的遗传多样性,之后许多学者利用他们提出的微卫星位点分别研究了贵州^[11]、海南^[12]、黄土高原^[13]、陕西秦巴山区^[14-15]等地的中华蜜蜂遗传多样性。然而,利用微卫星标记对中国多个地点的中华蜜蜂自然群体遗传多样性进行研究的报道,目前很难见到。为此,本研究基于刘璐等人^[16]在研究重庆地区的中华蜜蜂遗传分化时提出的15个东方蜜蜂微卫星位点对四川阿坝、黄土高原、海南岛、浙闽丘陵、滇南地区等地的中华蜜蜂自然群体进行遗传多样性和遗传分化进行分析,以期中华蜜蜂种质资源保护及良种选育工作提供参考依据。

* 收稿日期:2019-03-08 修回日期:2019-04-12 网络出版时间:2019-05-09 19:30

资助项目:农业部现代农业产业技术体系建设专项资金(No. CARS-44-KXJ21)

第一作者简介:张爽,女,研究方向为生物化学与分子生物学,E-mail:m177549261991@163.com;通信作者:许金山,男,教授,博士,E-mail:xujinshan2003@aliyun.com

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20190509.1930.042.html>

1 材料和方法

1.1 实验材料

中华蜜蜂样本于四川阿坝、海南岛、滇南地区等地各分别采集 10 群,于黄土高原、浙闽丘陵等地各分别采集 9 群。所有样本均浸泡在无水乙醇中并放置于 4 °C 冰箱内保存备用。

1.2 实验操作及方法

1.2.1 DNA 提取 去除中华蜜蜂样本腹部,余下组织采用 CTAB 法提取 DNA。用 NanoDrop 检测 DNA 质量浓度,并用质量分数为 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性。

1.2.2 PCR 扩增 基于东方蜜蜂基因组微卫星筛选分析^[16],选取了 Acc001, Acc002, Acc004, Acc008, Acc044, Acc050, Acc055, Acc064, Acc096, Acc114, Acc121, Acc128, Acc131, Acc132, Acc134 等 15 个微卫星位点对样本基因组进行分析。微卫星 DNA 的 PCR 反应体系为 20 μ L,其中包括上下游引物各 1 μ L, DNA 样本 1 μ L, premix Taq 10 μ L, 剩余体积用 ddH₂O 补齐。PCR 反应程序为:95 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min, 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 该过程共进行 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。之后用质量分数为 8% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 PCR 扩增产物,根据电泳结果,判断 15 个微卫星标记在 5 个自然群体间的基因分型情况。

1.2.3 种群遗传统计分析 利用 Popgen 1.32 计算 5 个自然群体在 15 个微卫星位点上的观测杂合度、期望杂合度、等位基因数、群体间的遗传距离和遗传相似数指数,利用 Genepop 4.2 软件计算群体间的遗传分化指数,利用 PIC-CALC 软件计算多态信息含量。

2 结果与分析

2.1 微卫星位点遗传多样性

表 1 显示:在 5 个中华蜜蜂自然群体 15 个微卫星位点上共检测到 64 个等位基因。各位点的等位基因数量在 2~6 个之间,其中等位基因数最多和最少的位点分别为 Acc134 和 Acc050。所有位点的等位基因数平均为 4.266 7 个。各位点观测杂合度在 0.189 2~0.977 8 之间,平均值为 0.607 3,有 8 个位点的观测杂合度高于平均值。各位点期望杂合度在 0.219 5~0.813 6 之间,平均值为 0.618 1,有 9 个位点的期望杂合度高于平均值。此外,各位点的多态信息量在 0.198 1~0.775 5 之间,平均值为 0.548 1,有 9 个位点的多态信息量高于平均值。

表 1 中华蜜蜂 15 个微卫星位点的遗传多样性参数

Tab.1 Genetic diversity parameters of 15 microsatellite loci of *A. cerana cerana*

位点	等位基因 个数	观测 杂合度	期望 杂合度	多态 信息量	位点	等位基因 个数	观测 杂合度	期望 杂合度	多态 信息量
Acc001	3.000 0	0.189 2	0.568 3	0.477 2	Acc096	4.000 0	0.619 0	0.631 4	0.558 7
Acc002	4.000 0	0.214 3	0.622 8	0.555 3	Acc114	5.000 0	0.604 7	0.645 7	0.572 2
Acc004	5.000 0	0.795 5	0.783 4	0.739 4	Acc121	5.000 0	0.428 6	0.686 1	0.616 7
Acc008	4.000 0	0.641 0	0.607 1	0.543 7	Acc128	3.000 0	0.195 1	0.219 5	0.198 1
Acc044	4.000 0	0.888 9	0.564 3	0.462 6	Acc131	5.000 0	0.378 4	0.724 2	0.668 1
Acc050	2.000 0	0.977 8	0.505 4	0.374 9	Acc132	5.000 0	0.472 2	0.726 5	0.674 8
Acc055	5.000 0	0.933 3	0.649 4	0.580 2	Acc134	6.000 0	0.950 0	0.813 6	0.775 5
Acc064	4.000 0	0.822 2	0.523 6	0.423 5	平均值	4.266 7	0.607 3	0.618 1	0.548 1

2.2 中华蜜蜂 5 个自然群体的遗传多样性

2.2.1 等位基因多样性 四川阿坝群体和滇南地区群体在 15 个微卫星位点上均共检测出 46 个等位基因,平均每个位点有 3.066 7 个等位基因,数量最多;海南岛群体共检测到 43 个等位基因,平均每个位点有 2.866 7 个等位基因;浙闽丘陵群体共检测到 42 个等位基因,平均每个位点有 2.8 个等位基因;黄土高原群体共检测到 39 个等位基因,平均每个位点检测到 2.6 个等位基因,数量最少(表 2)。

表 2 5 个中华蜜蜂群体的等位基因数

Tab. 2 The number of alleles of five *A. cerana cerana* populations

个

位点	四川阿坝 群体	黄土高原 群体	海南岛 群体	浙闽丘陵 群体	滇南地区 群体	位点	四川阿坝 群体	黄土高原 群体	海南岛 群体	浙闽丘陵 群体	滇南地区 群体
Acc001	2.000 0	2.000 0	2.000 0	2.000 0	2.000 0	Acc096	3.000 0	4.000 0	3.000 0	3.000 0	4.000 0
Acc002	3.000 0	3.000 0	2.000 0	2.000 0	3.000 0	Acc114	4.000 0	2.000 0	3.000 0	2.000 0	4.000 0
Acc004	4.000 0	2.000 0	3.000 0	4.000 0	4.000 0	Acc121	3.000 0	2.000 0	5.000 0	3.000 0	2.000 0
Acc008	3.000 0	2.000 0	4.000 0	3.000 0	4.000 0	Acc128	1.000 0	2.000 0	2.000 0	2.000 0	3.000 0
Acc044	2.000 0	4.000 0	2.000 0	2.000 0	4.000 0	Acc131	3.000 0	4.000 0	2.000 0	4.000 0	3.000 0
Acc050	2.000 0	2.000 0	2.000 0	2.000 0	2.000 0	Acc132	4.000 0	2.000 0	4.000 0	3.000 0	2.000 0
Acc055	5.000 0	2.000 0	3.000 0	2.000 0	2.000 0	Acc134	4.000 0	4.000 0	4.000 0	5.000 0	4.000 0
Acc064	3.000 0	2.000 0	2.000 0	3.000 0	3.000 0	平均值	3.066 7	2.600 0	2.866 7	2.800 0	3.066 7

2.2.2 杂合度 分析 5 个中华蜜蜂自然群体 15 个微卫星位点基因型的杂合度,可知:四川阿坝群体基因型观测杂合度为 0.608 2,期望杂合度为 0.566 7;海南岛群体基因型观测杂合度为 0.664 3,期望杂合度 0.544 1;浙闽丘陵群体基因型观测杂合度为 0.648 7,期望杂合度 0.557 8;滇南地区群体基因型观测杂合度为 0.580 2,期望杂合度 0.540 7;黄土高原群体基因型观测杂合度为 0.550 3,期望杂合度 0.524 4,均为最低(表 3)。

表 3 5 个中华蜜蜂群体 15 个微卫星位点的观测杂合度和期望杂合度

Tab. 3 Observed heterozygosities and expected heterozygosities of 15 microsatellite loci of five *A. cerana cerana* populations

位点	四川阿坝群体		黄土高原群体		海南岛群体		浙闽丘陵群体		滇南地区群体	
	观测 杂合度	期望 杂合度	观测 杂合度	期望 杂合度	观测 杂合度	期望 杂合度	观测 杂合度	期望 杂合度	观测 杂合度	期望 杂合度
Acc001	0.125 0	0.525 0	0.000 0	0.355 6	0.111 1	0.111 1	0.571 4	0.439 6	0.125 0	0.525 0
Acc002	0.333 3	0.307 2	0.500 0	0.625 0	0.000 0	0.522 9	0.000 0	0.470 6	0.285 7	0.472 5
Acc004	0.888 9	0.758 2	0.888 9	0.522 9	1.000 0	0.660 1	0.750 0	0.766 7	0.444 4	0.679 7
Acc008	0.750 0	0.708 3	0.500 0	0.400 0	0.875 0	0.691 7	0.857 1	0.615 4	0.250 0	0.591 7
Acc044	0.666 7	0.470 6	1.000 0	0.634 0	1.000 0	0.529 4	0.888 9	0.522 9	0.888 9	0.705 9
Acc050	1.000 0	0.529 4	1.000 0	0.529 4	1.000 0	0.529 4	1.000 0	0.529 4	0.888 9	0.522 9
Acc055	1.000 0	0.790 8	0.777 8	0.503 3	1.000 0	0.660 1	1.000 0	0.529 4	0.888 9	0.522 9
Acc064	0.888 9	0.601 3	0.666 7	0.470 6	0.777 8	0.503 3	0.888 9	0.568 6	0.888 9	0.568 6
Acc096	0.142 9	0.604 4	0.777 8	0.660 1	0.777 8	0.660 1	0.555 6	0.503 3	0.750 0	0.675 0
Acc114	0.555 6	0.607 8	0.875 0	0.525 0	0.666 7	0.620 9	0.250 0	0.233 3	0.666 7	0.575 2
Acc121	0.400 0	0.711 1	0.142 9	0.362 6	0.444 4	0.712 4	0.714 3	0.648 4	0.428 6	0.362 6
Acc128	0.000 0	0.000 0	0.111 1	0.294 1	0.375 0	0.325 0	0.222 2	0.209 2	0.250 0	0.241 7
Acc131	0.800 0	0.644 4	0.125 0	0.725 0	0.222 2	0.209 2	0.571 4	0.791 2	0.375 0	0.425 0
Acc132	0.571 4	0.571 4	0.000 0	0.500 0	0.714 3	0.626 4	0.571 4	0.703 3	0.571 4	0.439 6
Acc134	1.000 0	0.670 3	0.888 9	0.758 2	1.000 0	0.800 0	0.888 9	0.836 6	1.000 0	0.802 2
平均值	0.608 2	0.566 7	0.550 3	0.524 4	0.664 3	0.544 1	0.648 7	0.557 8	0.580 2	0.540 7

2.2.3 多态信息量 考察 5 个中华蜜蜂自然群体 15 个微卫星位点平均多态信息量,可知:四川阿坝群体的平均多态信息量最高,为 0.492 7;海南岛、浙闽丘陵、滇南地区等地群体的平均多态信息量依次分别为 0.441 3, 0.448 1, 0.437 3;黄土高原群体的平均多态信息量最低,为 0.410 3(表 4)。从表 4 还可以看出:四川阿坝群体 Acc055 位点上的多态信息量为 0.709 2,与该群体其他微卫星位点的多态信息量相比为最高;黄土高原、海南岛、浙闽丘陵、滇南地区等 4 地的群体 Acc134 位点上的多态信息量与各自群体其他微卫星位点相比均为最高,分别

为 0.662 7,0.703 1,0.756 0,0.697 4;四川群体 Acc128 位点未检测到多态性,多态信息量为 0.000 0。

表 4 5 个中华蜜蜂群体 15 个微卫星位点的多态信息量

Tab. 4 PIC values of 15 microsatellite loci of five *A. cerana cerana* populations

位点	四川阿坝 群体	黄土高原 群体	海南岛 群体	浙闽丘陵 群体	滇南地区 群体	位点	四川阿坝 群体	黄土高原 群体	海南岛 群体	浙闽丘陵 群体	滇南地区 群体
Acc001	0.371 1	0.268 8	0.099 5	0.324 9	0.371 1	Acc096	0.464 9	0.556 7	0.544 4	0.403 5	0.570 3
Acc002	0.268 7	0.519 7	0.371 9	0.345 7	0.386 2	Acc114	0.533 2	0.371 1	0.517 3	0.194 8	0.480 1
Acc004	0.665 8	0.371 9	0.552 6	0.667 5	0.583 0	Acc121	0.563 2	0.280 1	0.617 4	0.522 9	0.280 1
Acc008	0.590 1	0.304 7	0.592 5	0.501 5	0.510 5	Acc128	0.000 0	0.239 2	0.258 3	0.178 0	0.214 6
Acc044	0.345 7	0.515 9	0.375 0	0.371 9	0.602 1	Acc131	0.491 8	0.621 6	0.178 0	0.684 7	0.354 2
Acc050	0.375 0	0.375 0	0.375 0	0.375 0	0.371 9	Acc132	0.483 2	0.358 9	0.519 9	0.579 8	0.324 9
Acc055	0.709 2	0.362 4	0.552 6	0.375 0	0.371 9	Acc134	0.547 4	0.662 7	0.703 1	0.756 0	0.697 4
Acc064	0.488 9	0.345 7	0.362 4	0.440 9	0.440 8	平均值	0.492 7	0.410 3	0.441 3	0.448 1	0.437 3

2.3 中华蜜蜂 5 个自然群体间的遗传分化

F_{st} 表示种群遗传变异占总变异的比,反映种群遗传分化水平高低。利用 PopGene 1.32 软件得到中华蜜蜂 5 个自然群体间的遗传分化系数(F_{st})如表 5 所示。在 Acc001, Acc096 和 Acc131 位点上,四川阿坝群体与黄土高原、海南岛、浙闽丘陵、滇南地区等地的群体相比均表现出一定程度的遗传分化, F_{st} 在 0.067 3~0.450 5 之间;特别是位点 Acc001,四川阿坝群体与其他群体的 F_{st} 分别为 0.450 5,0.305 4,0.409 6 和 0.190 2。在 Acc114, Acc121 和 Acc132 位点上,黄土高原群体与海南岛、浙闽丘陵、滇南地区等地的群体均表现出一定程度的遗传分化, F_{st} 在 0.087 3~0.613 2 之间;在位点 Acc001 上,黄土高原群体与海南岛群体间 F_{st} 最高,为 0.719 1;在 Acc114 位点上,黄土高原群体与浙闽丘陵间群体的 F_{st} 最高,为 0.606 2;在 Acc121 位点上,黄土高原群体与滇南地区群体间 F_{st} 为 0.613 2。在 Acc001, Acc002, Acc004, Acc131 和 Acc132 位点上海南岛群体与浙闽丘陵、滇南地区等地的群体均表现出较强的遗传分化, F_{st} 在 0.151 5~0.660 6 之间;在位点 Acc001 上,海南岛群体与浙闽丘陵群体间 F_{st} 最高,为 0.628 8;在位点 Acc131 上,海南岛群体与滇南地区群体间 F_{st} 最高,为 0.660 6。此外,在 Acc002, Acc121 和 Acc131 位点上,浙闽丘陵与滇南地区群体间遗传分化极明显, F_{st} 在 0.274 1~0.304 9 之间。

2.4 遗传距离与遗传相似度

利用 PopGene 1.32 软件计算中华蜜蜂 5 个自然群体的遗传相似系数和遗传距离。从表 6 可知,5 个群体之间的遗传距离在 0.160 1~0.491 0 之间,遗传相似系数在 0.612~0.852 之间。遗传相似系数与遗传距离呈反比,群体间遗传距离越小,遗传相似系数越大;反之亦然。

3 讨论

3.1 遗传多样性

遗传多样性是维持群体发展进化和长期生存的基础,可用于衡量群体抵御不良环境能力^[17]。群体杂合度和等位基因数量是评估群体遗传多样性水平的重要参数。据报道,选择等位基因大于 4 的微卫星位点来衡量群体遗传多样性水平较为可靠^[18],但等位基因数在一定程度上也受样本量影响^[19]。本研究的 15 个微卫星位点中,等位基因数并不高,这应与样本量的大小有关,毕竟本研究只使用了较少的样本。基因杂合度也被认为是衡量群体遗传变异的另一个重要参数。杂合度值越大,群体遗传变异越大;反之则越小。本研究结果显示,中华蜜蜂 5 个自然群体的平均期望杂合度为 0.524 4~0.566 7,平均观测杂合度为 0.550 3~0.664 3,表明它们的遗传多样性较为丰富。其中四川阿坝群体平均观测杂合度和平均期望杂合度都较高,说明该群体变异度较高,遗传多样性相对丰富,对不良环境的抵御能力较强,因此有可能成为种质改良的潜在素材。

多态信息含量(PIC)是描述基因变异程度的最适参数之一。当 PIC 大于 0.5 时,该座位为高度多态性座位;PIC 在 0.25~0.5 之间时,为中度多态性座位;PIC 小于 0.25 时,为低度多态性座位^[20]。PIC 越大,说明基因一致性越低,变异性越高,选择的潜力也就越大。本研究的 15 个微卫星位点中, Acc002, Acc004, Acc008, Acc055,

Acc096, Acc114, Acc121, Acc131, Acc132 和 Acc134 共 10 个位点表现为高度多态性; Acc001, Acc044, Acc050 和 Acc064 共 4 个位点表现为中度多态性; 位点 Acc128 表现为低度多态性。因此总的来说, 本研究的 15 个微卫星位点的多态性较高, 而这些多态性较高的微卫星位点能为分析遗传多样性提供充分的信息, 利用潜力较大。

表 5 5 个中华蜜蜂群体在不同位点上的 F_{st}
Tab. 5 F_{st} of five *A. cerana cerana* populations at different loci

位点	群体	四川阿坝群体	黄土高原群体	海南岛群体	浙闽丘陵群体
Acc001	黄土高原群体	0.450 5			
	海南岛群体	0.305 4	0.719 1		
	浙闽丘陵群体	0.409 6	-0.092 1	0.628 8	
	滇南地区群体	0.190 2	0.103 0	0.266 4	0.061 1
Acc002	黄土高原群体	0.051 9			
	海南岛群体	0.280 9	0.077 5		
	浙闽丘陵群体	0.011 4	-0.048 7	0.250 0	
	滇南地区群体	0.549 5	0.279 8	0.456 2	0.304 9
Acc004	黄土高原群体	0.055 4			
	海南岛群体	0.046 6	0.040 8		
	浙闽丘陵群体	0.126 5	0.326 1	0.179 4	
	滇南地区群体	0.167 3	0.389 0	0.267 8	-0.013 2
Acc096	黄土高原群体	0.089 9			
	海南岛群体	0.079 6	-0.036 8		
	浙闽丘陵群体	0.153 2	-0.014 9	0.017 1	
	滇南地区群体	0.067 3	-0.051 8	-0.040 3	-0.020 0
Acc114	黄土高原群体	0.348 9			
	海南岛群体	0.145 4	0.087 3		
	浙闽丘陵群体	0.046 5	0.606 2	0.373 9	
	滇南地区群体	-0.028 2	0.364 1	0.121 6	0.065 5
Acc121	黄土高原群体	0.349 3			
	海南岛群体	-0.005 7	0.212 2		
	浙闽丘陵群体	0.091 8	0.112 1	-0.046 9	
	滇南地区群体	0.219 9	0.613 2	0.119 9	0.274 1
Acc131	黄土高原群体	0.110 9			
	海南岛群体	0.221 2	0.379 7		
	浙闽丘陵群体	0.136 1	0.005 3	0.343 2	
	滇南地区群体	0.366 1	0.071 9	0.660 6	0.299 5
Acc132	黄土高原群体	0.070 9			
	海南岛群体	-0.060 6	0.098 4		
	浙闽丘陵群体	0.160 0	0.239 8	0.151 5	
	滇南地区群体	0.461 5	0.513 2	0.435 9	0.066 7

表 6 5 个中华蜜蜂群体遗传相似系数和遗传距离
Tab. 6 Genetic identity and Nei's distance of five *A. cerana cerana* populations

群体	四川阿坝群体	黄土高原群体	海南岛群体	浙闽丘陵群体	滇南地区群体
四川阿坝群体		0.733 1	0.852 0	0.782 7	0.663 8
黄土高原群体	0.310 4		0.791 7	0.760 3	0.612 0
海南岛群体	0.160 1	0.233 6		0.747 2	0.654 6
浙闽丘陵群体	0.245 0	0.274 0	0.2915		0.841 3
滇南地区群体	0.409 8	0.491 0	0.423 8	0.172 8	

注: 右上角数据为遗传相似系数, 左下角数据为遗传距离

3.2 遗传分化及遗传距离

Wright^[21]指出: $F_{st} < 0.05$ 表示分化程度低, $0.05 < F_{st} < 0.15$ 表示分化程度中等, $0.15 < F_{st} < 0.25$ 表示分化程度高, $0.25 < F_{st} < 1$ 表示分化程度极高。因此,在 Acc001, Acc096 和 Acc131 位点上,四川阿坝群体与黄土高原、海南岛、浙闽丘陵、滇南地区等地的群体均表现出中高强度的遗传分化;在 Acc114, Acc121 和 Acc132 位点上,黄土高原群体与海南岛、浙闽丘陵、滇南地区等地的群体均表现出高强度的遗传分化;在 Acc001, Acc002, Acc004, Acc131 和 Acc132 位点上,海南岛群体与浙闽丘陵、滇南地区等地的群体均表现出较高程度的遗传分化;在 Acc002, Acc121 和 Acc131 位点上浙闽丘陵与滇南地区群体间遗传分化也较为明显。

参考文献:

- [1] HUBER K, LOAN L L, HOANG T H, et al. Genetic differentiation of the dengue vector, *Aedes aegypti* (Ho Chi Minh City, Vietnam) using microsatellite markers[J]. Molecular Ecology, 2002, 11(9): 1629-1635.
- [2] INSUAN S, DEOWANISH S, KLINBUNGA S, et al. Genetic differentiation of the giant honey bee (*Apis dorsata*) in Thailand analyzed by mitochondrial genes and microsatellites[J]. Biochemical Genetics, 2007, 45(4): 345-361.
- [3] SIMONA S, PETER K, JANEZ P, et al. Molecular characterisation of indigenous *Apis mellifera carnica* in Slovenia [J]. Apidologie, 2004, 35(6): 623-636.
- [4] De La RÚA P, HERNANDEZ GARCIA R, PEDERSEN B V, et al. Molecular diversity of honeybee *Apis mellifera iberica* L. (Hymenoptera: Apidae) from western Andalusia [J]. Archivos de Zootecnia, 2004, 53(202): 195-203.
- [5] De La RÚA P, GALIAN J, SERRANO J, et al. Microsatellite analysis of non-migratory colonies of *Apis mellifera iberica* from south-eastern Spain [J]. Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research, 2002, 40(3): 164-168.
- [6] 于瀛龙, 周妹婧, 徐新建, 等. 长白山中华蜜蜂 (*Apis cerana cerana*) 遗传多样性分析[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2013, 42(6): 643-647.
YU Y L, ZHOU S J, XU X J, et al. Analysis on genetic diversity of *Apis cerana cerana* in Changbai mountains [J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition), 2013, 42(6): 643-647.
- [7] 朱翔杰, 周冰峰, 吴显达, 等. 福建中华蜜蜂微卫星标记的遗传多样性分析[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2011, 40(4): 407-411.
ZHU X J, ZHOU B F, WU X D, et al. Genetic diversity of *Apis cerana cerana* in Fujian based on microsatellite markers [J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition), 2011, 40(4): 407-411.
- [8] 刘敏, 吉挺, 殷玲, 等. 武夷山中华蜜蜂形态特征与微卫星 DNA 标记的相关分析[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2009, 38(5): 532-536.
LIU M, JI T, YIN L, et al. Relationship between microsatellite DNA makers and morphology feature of *Apis cerana cerana* populations in Wuyi mountain [J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition), 2009, 38(5): 532-536.
- [9] 陈杨, 宗超, 余林生, 等. 皖南山区与皖西大别山区中华蜜蜂群体微卫星 DNA 遗传多样性研究[J]. 中国蜂业, 2011, 62(Z4): 8-11.
CHEN Y, ZONG C, YU L S, et al. Study on Microsatellite DNA Genetic Diversity of *Apis cerana cerana* in Wannan mountain area and Wanxi Da Bie mountain area [J]. Apiculture of China, 2011, 62(Z4): 8-11.
- [10] TAKAHASHI J, SHIMIZU S, KOYAMA S, et al. Variable microsatellite loci isolated from the Asian honeybee, *Apis cerana* (Hymenoptera: Apidae) [J]. Molecular Ecology Resources, 2010, 9(3): 819-821.
- [11] 于瀛龙, 周妹婧, 徐新建, 等. 贵州省东方蜜蜂微卫星 DNA 遗传分化与遗传多样性分析[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2017, 46(3): 323-328.
YU Y L, ZHOU S J, XU X J, et al. Genetic diversity and genetic differentiation of *Apis cerana* in Guizhou province of southwest China [J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition), 2017, 46(3): 323-328.
- [12] 徐新建, 周妹婧, 朱翔杰, 等. 海南岛中华蜜蜂遗传多样性的微卫星 DNA 分析[J]. 昆虫学报, 2013, 56(5): 554-560.
XU X J, ZHOU S J, ZHU X J, et al. Microsatellite DNA analysis of genetic diversity of *Apis cerana cerana* in Hainan island, southern China [J]. Acta Entomologica Sinica, 2013, 56(5): 554-560.
- [13] 徐新建, 周妹婧, 朱翔杰, 等. 黄土高原中华蜜蜂遗传多样性的微卫星 DNA 分析[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2013, 42(6): 638-642.
XU X J, ZHOU S J, ZHU X J, et al. Microsatellite DNA genetic diversity of *Apis cerana cerana* from the Loess Plateau, Northwest China [J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition), 2013, 42(6): 638-642.
- [14] 郭慧萍, 周妹婧, 朱翔杰, 等. 秦巴山区中华蜜蜂种群微卫星 DNA 遗传分析[J]. 昆虫学报, 2016, 59(3): 337-345.
GUO H P, ZHOU S J, ZHU X J, et al. Population genetic

analysis of *Apis cerana cerana* from the Qinling-Daba mountain areas based on microsatellite DNA[J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2016, 59(3):337-345.

[15] 李婉玫. 基于微卫星和线粒体 DNA 的陕西秦巴山区中华蜜蜂遗传多样性研究[D]. 西安:陕西师范大学, 2017.

LI W M. Genetic diversity of Chinese honeybees in Qinba Mountain, Shaanxi Province based on microsatellite and mitochondrial DNA[D]. Xi'an: Shaanxi Normal University, 2017.

[16] LIU L, QIN M Z, YANG L, et al. A genome-wide analysis of simple sequence repeats in *Apis cerana* and its development as polymorphism markers[J]. *Gene*, 2017, 599: 53-59.

[17] 沈浩, 刘登义. 遗传多样性概述[J]. *生物学杂志*, 2001, 18(3):5-7.

SHEN H, LIU D Y. Overview of genetic diversity[J].

Journal of Biology, 2001, 18(3):5-7.

[18] BARKER J S F. Sequential gel electrophoretic analysis of esterase-2 in two populations of *Drosophila buzzatii* [J]. *Genetica*, 1994, 92(3):165-175.

[19] 高雅, 李生斌. 样本量对等位基因检出数量的影响[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2008(8):7-9.

GAO Y, LI S B. The effect of sample size on the number of alleles detected [J]. *Journal of eugenics and genetics of China*, 2008(8):7-9.

[20] BOTSTEIN D, WHITE R, SKOLNICK M. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. *American Journal of Human Genetics*, 1980, 32:314-331.

[21] WRIGHT S. The genetical structure of populations [J]. *Annals of Eugenics*, 1951, 15(4):323-354.

Animal Sciences

The Analysis of Genetic Diversity on Five Wild Populations of *Apis cerana cerana* with Simple Sequence Repeat Markers

ZHANG Shuang, ZHOU Jun, HU Chong, LU Yan, SHI Peng, XU Jinshan
(Chongqing key Laboratory of Vector Insects, Chongqing Key Laboratory of Animal Biology,
Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract: [Purposes] Genetic diversity of five *Apis cerana cerana* natural populations in Sichuan Aba, Loess Plateau, Hainan Island, Zhejiang-Fujian hilly, and Southern Yunnan Province was analyzed. [Methods] PCR implications were performed after genomic DNAs of samples were extracted, and then PAGEs were accomplished. By calculating several parameters including number of alleles, polymorphic information content, expected heterozygosity, observed heterozygosity, Nei's distance, genetic similarity coefficient and genetic differentiation coefficient of 15 pairs of simple sequence repeat markers in five *Apis cerana cerana* wild populations, the genetic diversity and the genetic differentiation of each population were evaluated. [Findings] A total of 64 alleles were detected at all loci for all the samples, with an average of 4.266 7 alleles per locus and 2~6 alleles per locus. The average allele number of each population was ranged from 2.6 to 3.066 7, the average observed heterozygosity of each population was ranging from 0.550 3 to 0.664 3, the average expected heterozygosity of each population was 0.524 4~0.566 7, and the polymorphic information content of the 5 populations was 0.410 3~0.492 7. There were obvious differentiation between Sichuan Aba population and any of the other population at three allele loci (Acc001, Acc096, and Acc131). The Loess Plateau population showed a certain degree of genetic differentiation with the populations in Hainan Island, Zhejiang-Fujian hilly, and Southern Yunnan Province at three allele loci (Acc114, Acc121, and Acc132). The population of Hainan Island, Zhejiang-Fujian hilly, and Southern Yunnan Province showed strong genetic differentiation at five sites (Acc001, Acc002, Acc004, Acc131, and Acc132). The genetic differentiation between the Zhejiang-Fujian hilly, and Southern Yunnan Province populations was very obvious at three loci (Acc002, Acc121, and Acc131). The Nei's distance between the five natural populations ranged from 0.160 1 to 0.491 0. [Conclusions] In summary, the genetic diversity of five natural *Apis cerana cerana* populations was high, and the pairwise genetic differentiation among populations was obvious.

Keywords: microsatellite markers; *Apis cerana cerana*; wild population; genetic diversity

突伪叶甲亚科 5 个中国新纪录种记述*

梁志红, 陈斌

(重庆师范大学昆虫与分子生物学研究所 媒介昆虫重庆市重点实验室, 重庆 401331)

摘要:【目的】补充突伪叶甲亚科(Statirinae)中国种类及分布情况。【方法】采用传统形态分类鉴定法,在查阅相关文献基础上通过显微镜进行标本观察和鉴定。【结果】鉴定出突伪叶甲亚科 5 个中国新纪录种,分别为:印管伪叶甲(*Donaciolagria impressipennis* Pic, 1914)、四斑外伪叶甲(*Exostira bisbimaculata* Pic, 1935)、富士大伪叶甲(*Macrolagria fujisana* Lewis, 1895)、粗头大伪叶甲(*Macrolagria robusticeps* (Lewis, 1895))和紫色丘伪叶甲(*Sora purpureipennis* Borchmann, 1930)。对这 5 个新纪录种作了详细描述,提供了整体图及雄性阳茎图,更新了它们的地理分布。【结论】研究结果对于突伪叶甲亚科昆虫的系统分类和生物地理学研究具有一定的科学意义,也为更好地利用该亚科的资源提供一定帮助。

关键词:突伪叶甲亚科;伪叶甲科;拟步甲总科;鞘翅目;新纪录;中国

中图分类号:Q969.498.6

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2019)03-0051-05

突伪叶甲亚科(Statirinae)隶属于鞘翅目(Coleoptera)拟步甲总科(Tenebrionidea)伪叶甲科(Lagriidae)。迄今为止,全球已经描述的突伪叶甲亚科昆虫大约有 1 109 种(亚种),主要分布于美洲、澳大利亚、新几内亚、非洲和欧亚大陆,尤其以热带非洲和东南亚最为丰富,美洲和古北区的种类相对贫乏^[1]。

Borchmann^[2]首次较全面地总结了世界伪叶甲类昆虫,将伪叶甲科分为 6 个亚科,其中伪叶甲亚科(Lagriinae)和突伪叶甲亚科共 115 个属,33 亚属(包括 26 新属和 2 新亚属),1 798 种和 158 变种(包括 178 新种和 16 新变种),为以后伪叶甲类的研究提供了依据。Watt^[3]通过 21 个成虫特征和 15 个幼虫特征,利用支序分类的原理及总体相似性和统计衍生特征的方法,把传统的伪叶甲科降至拟步甲科(Tenebrionidae)的 1 个亚科,将 Borchmann 的伪叶甲亚科和突伪叶甲亚科降为伪叶甲亚科的族级阶元。Bouchard^[4-5]将伪叶甲科作为拟步甲科下属亚科,包括了 9 个族,其中伪叶甲族(Lagriini)包括伪叶甲亚族(Lagriina)和突伪叶甲亚族(Statirina)。

中国突伪叶甲亚科昆虫早期的种类基本全部由外国人记述和命名。直到 1995 年,陈斌^[1]首次对中国伪叶甲科进行了总结,共记述突伪叶甲亚科 18 属 88 种,还对雄性外生殖器进行了研究;2003 年,朱玉香对中国 2 种突伪叶甲亚科昆虫做了记述,并对雄性外生殖器做了研究。

目前,突伪叶甲亚科的管伪叶甲属(*Donaciolagria*)、外伪叶甲属(*Exostira*)、大伪叶甲属(*Macrolagria*)和丘伪叶甲属(*Sora*)昆虫在世界上的已知分布分别有 10,25,6 和 179 种;在中国的已知分布分别有 5,2,1 和 14 种。本研究在已有研究基础上,通过比较上述属种的中国已知种类,确定并报道 5 个中国新纪录种,分别是印管伪叶甲(*Donaciolagria impressipennis* Pic, 1914)、四斑外伪叶甲(*Exostira bisbimaculata* Pic, 1935)、富士大伪叶甲(*Macrolagria fujisana* Lewis, 1895)、粗头大伪叶甲(*Macrolagria robusticeps* (Lewis, 1895))和紫色丘伪叶甲(*Sora purpureipennis* Borchmann, 1930)。由于上述 5 个新纪录种已有的文献描述过于简单且缺乏相关特征图,故本研究还提供了详细描述及主要鉴别特征图。本研究为促进和完善中国突伪叶甲亚科乃至拟步甲总科的分类研究提供了重要理论依据。

1 材料与方法

本研究沿用的是 Borchmann^[2]在 1936 年时所划分的分类阶元。成虫标本的观察、鉴定及雄性外生殖器的

* 收稿日期:2019-01-08 修回日期:2019-04-04 网络出版时间:2019-05-09 19:29

资助项目:科学技术部科技基础性工作专项(No. 2015FY210300);国家自然科学基金(No. 31672363);广西科技重大项目(No. GKAA17129002)

第一作者简介:梁志红,女,研究方向为昆虫学,E-mail: lsr123@cqnu.edu.com;通信作者:陈斌,男,教授,博士生导师,E-mail: c_bin@hotmail.com

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20190509.1929.008.html>

解剖在体视显微镜(Olympus SZ61)下进行,解剖获得的外生殖器用溶质体积分数为 90%的乙醇溶液保存;照片的拍摄和测量通过连接电脑的体视显微镜(KEYENCE-VHX-5000)进行,描述中使用的比值在相同放大倍数下测量。研究中所用检测标本来自重庆师范大学昆虫与分子生物学研究所、中国科学院北京动物研究所及中国科学院上海昆虫博物馆。

2 新纪录种描述

2.1 印管伪叶甲

拉丁学名:*Donaciolagria impressipennis* Pic, 1914: 14^[6]。

主要特征:体蓝绿色,具光泽,前胸背板蓝黑色,触角和足黑色(后足腿节 1/2 处为黄褐色),腹面除腹部黄色外,其余部分都为蓝黑色,具紫色光泽。除头部和前胸背板前后缘具稀疏的长茸毛外,背面观几乎光滑无毛,腹部具稀疏的短茸毛,胫节、跗节和触角具密集的短茸毛(封三彩图 1a~f)。

1) 雄性:体较粗短,体长 10.3~12.1 mm(封三彩图 1a,b)。头部延长,呈长三角形;颊、唇基和上唇具稀疏的细刻点,额区具密集的粗刻点;额唇基沟深,呈弧形;唇基前缘直;节间膜明显,宽且浅,黄褐色;上唇延长,前缘中部稍稍凹陷;下颚须末节长短刀形;复眼大,肾形,眼间距约为复眼直径的 1.5 倍;触角长,向后时超过了后足基节;第 1 节粗短,第 2 节最短,触角末节约与其前 4 节之和等长,触角各节长度比为 4:2:6:6:6:7:6:6:5:5:22(封三彩图 1c)。前胸背板宽大于长(21:17),中部稍前方最宽,基部前较强烈收缩,光滑无刻点;前角圆,后角向侧方凸出,前缘细,后缘宽,抬起,侧缘不可见;中部隆凸,两侧各具 1 个大且深的坑;前胸腹板突窄,约与前足基节的 1/2 等高,明显分隔开基节。小盾片长舌形,光滑无毛无刻点(封三彩图 1d)。鞘翅向后变窄,肩角后方最宽,约为前胸背板宽的 2 倍(21:38);肩角强烈凸出;鞘翅基部 1/4 几乎无刻点,向后刻点稀疏且细,刻点不成列,刻点间距大,不形成横皱纹;鞘翅缘折明显,前 1/4 处最宽,向后逐渐变短,伸达鞘翅末端。中胸腹板具稀疏的短茸毛,无刻点,中胸前侧片具密集的粗刻点和茸毛,形成短的横皱纹;后胸腹板具稀疏的短茸毛,无可点,中部具 1 条浅的纵向压痕。足细长,无变形,后足最长;腿节棒状,从基部向端部逐渐变粗,后足腿节最粗壮。腹部不具刻点,雄性具小的第 6 腹板;具稀疏的短茸毛,后两节具较密集的长茸毛。阴茎侧面观和正面观如封三彩图 1e,f 所示。

2) 雌性:暂未见标本。

标本记录:1♂,云南省腾冲县界头镇大塘乡 2 030 m,北纬 25°44'44"、东经 98°41'46",2006. V. 15,梁红斌采;1♂,云南盈江 1 700 m,1980. IV. 16,杨思周采。

分布:中国(云南);越南;老挝^[7]。

讨论:Merk1^[7]在 2011 年见到了此种雌性的模式标本,虽未进行详细描述,但给出了关键性的鉴别特征,拍摄了清晰的整体图;与雄性标本相比,雌性个体较粗壮,触角末节相当短。本研究所观察的标本都为雄性,为中国新纪录种,与采集于老挝和越南的标本有差异:后者雌性的前胸背板的前角尖锐凸出,雄性稍凸出,足单一的黑色,其他特征都与采集于中国的标本特征相符合,猜测可能为环境差异所造成。

2.2 四斑外伪叶甲

拉丁学名:*Exostira bisbimaculata* Pic, 1935: 22; Merkl, 2004: 300^[8]。

主要特征:体背腹面均为茶褐色,具光泽,鞘翅色泽稍浅,后足黄褐色;体被密集的淡黄色长竖毛,尤其是足上的茸毛更长更密集(封三彩图 2a~g)。

1) 雄性:身体延长,体长 13.8~14.5 mm(封三彩图 2a)。头长三角形,长大于宽,略窄于前胸背板,上唇前缘稍凹陷,唇基前缘直,淡黄色关节膜宽而明显,额唇基沟宽弧形;下颚须末节短刀形;额区具细小刻点,头顶不隆凸,颊短于复眼之半,颈沟深,颈明显;复眼隆凸,前后缘均凹陷,背方间距小于复眼直径之半,腹方间距约等于复眼直径;触角线形,相当长,基节约等于其后 2 节之和,触角末节稍短于其前 3 节之和,触角各节长度比为 8:3:6:7:7:7:8:7:7:6:17(封三彩图 2c)。前胸背板较长,略呈钟形,长为宽的 1.2 倍(22:18);中前方及后缘处最宽;密布细小刻点;前角圆形,后角侧向圆形突出,前后缘可见,后缘抬起,基部两侧弧形收狭,侧缘不可见;前足基节间腹板突在基节后甚伸长(封三彩图 2e)。鞘翅长为宽的 4 倍(146:34);除翅缝处一段短的刻点列,向外各 10 条刻点列,列间距近等,列间无隆起,刻点列粗而直,所有列间具众多的细小毛刻点;肩部几无隆起。每个鞘翅 1/3 处及 2/3 处各具 1 个圆形黑斑;缘折完整。前足腿节呈强烈三角形膨大,前足胫节向内侧弯

曲;中足常形;后足胫节有 1 个小的三角形突起(封三彩图 2d)。腹部 5 节;具刻纹;具节间膜。阴茎侧面观和正面观如封三彩图 2f,g 所示。

2) 雌性:体长 14.2~14.8 mm(封三彩图 2b)。眼间距稍宽与雄性;触角末节稍短于雄性;足常形,无变形。

标本记录:1♂,香港大埔区沙螺洞 187 m,北纬 22°28'32"、东经 114°10'54",2013. IV. 14,林美英采;1♂,云南屏边马卫 900~950 m,2009. V. 22;1♀,云南盈江 700 m,1980. IV. 15;1♀,云南怒江州贡山县独龙江乡马库村 1 228 m,北纬 27°24'40"、东经 98°9'46",2015. IV. 24,林美英采;1♀,海南岛尖峰天池 900 m,1980-IV-11,王书永采;1♀,福建沙长,1981。

分布:中国(福建、海南、云南和香港);越南^[9-10]。

讨论:此种体被长茸毛,每个鞘翅 1/3 处及 2/3 处各具 1 个圆形黑斑,特征明显,易与其他种区分开来。

2.3 富士大伪叶甲

拉丁学名:*Macrolagria fujisana* Lewis, 1895: 423^[11]。

主要特征:体粗短,较扁平,稍具光泽;下颚须、头、前胸背板和触角红褐色至黑褐色,鞘翅褐色至黑褐色,中后胸、腹部及足黑褐色至黑色;前胸背板及鞘翅光滑无毛,触角和足具密集的短茸毛,其余部分具长短不等的稀茸毛,头部的茸毛较长(封三彩图 3a~f)。

1) 雄性:体较粗短,体长 9.6~10.5 mm(封三彩图 3a)。头长略大于宽,窄于前胸;下颚须短刀形;上唇心形,上唇及唇基前缘稍凹陷,上唇及唇基间膜清楚,浅灰色至红褐色;额唇基沟宽而浅,弧形;额区平坦,具密集的细刻点;两复眼内侧中央具 1 个不大的坑(有些个体坑不甚清楚);颊短于复眼直径;颈长,颈沟清楚;复眼隆凸,眼间距约为复眼直径的 4 倍;触角较粗短,伸达鞘翅中部,末端逐渐增粗,端节末端尖,稍长于其前 2 节之和,触角各节长度比为 3:2:4:5:5:5:5:5:5:4:10(封三彩图 3c)。前胸背板宽略大于长(53:45);具密集的细刻点;前角尖锐抬起,后角钝,前后缘均弱小,前缘弧形凹陷,基部两侧凹陷,中部稍前方最宽;前胸腹板突窄,稍抬起,约为前足基节的 1/2 高,明显分开基节;后胸腹板中央具 1 条明显的纵向压痕。中胸小盾片舌形,褐色,具稀刻点(封三彩图 3d)。鞘翅宽为前胸背板的 2.17 倍(115:53),长为宽为 2.2 倍(252:115),略扁平,向后方稍增宽;小盾片两侧各具 1 条短的刻点列,随后两侧各具 10 条清楚的长刻点列,第 1 条和第 10 条刻点列伸达鞘翅末端并汇集于一点,其余皆近达鞘翅末端,列上刻点粗大而密;鞘翅末端钝尖,端前方稍凹陷;鞘翅缘折较宽,向后逐渐变窄,伸达鞘翅末端。足细长,腿节稍成棒状,胫节无变形。腹部第 1~5 可见腹板具稀疏且细小的刻点,第 3 与第 4 腹板、第 4 与第 5 腹板间具节间膜,腹部具密集的短茸毛,中部黑褐色,两侧颜色较浅。阴茎侧面观和正面观如(封三彩图 1e,f)所示。

2) 雌性:体较粗壮,体长 10.9~11.3 mm(封三彩图 3b)。两复眼内侧中央的坑更清楚,前胸背板的前角更加尖锐,触角末节短于其前两节之和,腹板间的节间膜不甚清楚。

标本记录:2♂♂,湖北宜昌大老岭林场,2010. V. 2,周俊采;1♂,湖北宜昌大老岭林场,2010. V. 1,谢广林采;1♂,湖北宜昌大老岭林场,2010. V. 2,谢广林采;1♀,湖北宜昌大老岭林场,2010. V. 2,周俊采;1♀,湖北宜昌大老岭林场,2010. V. 1,周俊采;1♀,湖北宜昌大老岭林场,2010. V. 1,李伟采;1♀,湖北宜昌大老岭林场,2010. V. 1,谢广林采;2♀♀,浙江临安西天目 350 m,2008. V. 5-8;1♀,浙江天目山,1980. V. 4。

分布:中国(浙江、湖北);日本^[12]。

讨论:此种体几乎不具茸毛,前胸背板前角尖锐抬起,后角钝。

2.4 粗头大伪叶甲

拉丁学名:*Eutrapela robusticeps* Lewis, 1895: 276^[11]; Borchmann, 1910: 13. *Arthromacra robusticeps*: Borchmann, 1915: 131^[13]; Kono, 1929: 32^[14]; Borchmann, 1936: 185^[2]. *Macrolagria robusticeps*: Masumoto, 1987: 48^[12]。

主要特征:体暗黑褐色,头和前胸背板黑褐色,鞘翅褐铜色,下颚须、触角、胫节和跗节褐色,有时腿节末端黑色;身体被相当密集的长毛(封三彩图 4a~f)。

1) 雄性:体延长,体长 9.1~10.3 mm(封三彩图 4a)。头明显大于宽,头宽略窄于前胸宽,额区平坦,具密而粗的刻点;下颚须端节长短刀形;上唇和唇基颜色较浅,前缘不凹陷,具不甚明显的关节膜,额唇基沟弧形,较浅;复眼细长,凸出,前缘不甚凹陷;眼间距甚宽于复眼直径;颊短;触角细长,具密集的刚毛,触角第 1 节粗壮,第 2 节短,末节等于其前 2 节之和,触角各节长度比为 4:2:5:4:4:4:5:4:5:4:9(封三彩图 4c)。前胸背板

宽略大于长相等(12 : 15), 稍呈圆筒形, 背面适度隆凸, 及粗且密的刻点, 前角几乎圆形, 前缘细, 后缘明显, 侧缘几乎不可见, 中部稍前方最宽, 基部两侧明显收缩; 中胸小盾片舌形, 褐色, 具稀刻点(封三彩图 4d)。鞘翅长约为宽的 4 倍(91 : 25), 宽明显大于前胸背板宽(25 : 15), 小盾片两侧各具 1 条短的刻点列, 鞘翅两侧各具 10 条清楚的刻点列, 第 1 条和第 10 条刻点列伸达鞘翅末端并汇集于一点, 其余皆近达鞘翅末端, 列上刻点较大而横, 列间稍隆凸, 鞘翅具稀疏的毛刻点。腹部第 1~5 可见腹板具稀疏且细小的刻点, 具不甚清楚的短茸毛, 中部黑色, 两侧颜色较浅。阳茎侧面观和正面观如封三彩图 4e, f 所示。

2) 雌性: 体形较大, 体长 10.1~11.2 mm(封三彩图 4b)。触角末节稍短于雄性。

标本记录: 2♂ 2♀, 浙江临安西天目 350 m, 2008. V. 5-8; 1♂ 1♀, 浙江天目山, 1980. V. 4; 1♂, 湖南宜章莽山 700 m, 2001. IV. 20, 魏美才采; 1♂, 福建崇安星村三港 740 m, 1960. V. 24, 张毅然采。

分布: 中国(浙江、福建、湖南); 日本(北海道、四国、本州、九州、屋久岛)^[12]。

讨论: 此种体具密集的茸毛, 前胸背板前角和后角钝。

2.5 紫色丘伪叶甲

拉丁学名: *Sora purpureipennis* Borchmann, 1930: 482^[15]。

主要特征: 体具较强的光泽, 头部背面黑褐色, 前胸背板褐黄色, 鞘翅紫蓝色, 中胸小盾片及缘折黄褐色; 布稀疏的短茸毛, 前胸背板光滑无毛(封三彩图 5a~f)。

1) 雄性: 体长 15.4~16 mm(封三彩图 5a)。头长略大于宽(60 : 53), 与前胸背板等宽(53 : 53), 不粗不稀的刻点; 上唇心形, 前缘稍凹陷, 具宽的关节膜, 唇基较小, 前缘略平直, 额唇基沟深弧形; 额区中央具 1 个纵向的浅坑, 头顶浅隆凸, 颊略短于复眼横径, 颈部明显; 复眼稍隆凸, 腹方眼间距甚大于复眼横径, 背方眼间距与横径约等长; 触角伸达鞘翅中部, 端节稍较短, 触角各节长度比为 11 : 2 : 9 : 10 : 11 : 10 : 10 : 9 : 10 : 10 : 15(45 : 40)(封三彩图 5c)。前胸背板长略大于宽(59 : 53), 略呈长筒形, 密布粗大刻点; 前缘细, 后缘宽地抬起, 四角较清楚; 基部两侧稍收缩, 末端稍变窄(封三彩图 5d)。鞘翅长为宽的 2.57 倍(275 : 107), 是前胸背板宽的 2 倍(107 : 53), 向后方稍膨大; 刻点沟粗, 向末端较浅, 第 1 和 10 条伸达末端, 其余近达末端; 沟间隆凸, 奇数沟间具 1~5 个毛刻点, 第 1 沟间毛刻点甚多; 末端前方稍收缩, 缘折与鞘翅不同色。前足基节间腹板突在顶端之后呈纵向片状扩大, 边缘锐利。腹面观黄色, 具较密集的长茸毛。阳茎侧面观和正面观如封三彩图 5e, f 所示。

2) 雌性: 体更粗壮, 雄虫体色略深(封三彩图 5b); 触角端节略长于其前 2 节之和(33 : 31), 眼间额无坑; 鞘翅更细长。

标本记录: 1♂, 湖北省利川市 3 800 m, 1989. VII. 23, 张晓春采; 1♂, 湖北神龙架木鱼坪 1 250 m, 1981. VII. 5, 韩寅恒采; 1♂, 湖南桑植天平山 1 050 m, 1988. VIII. 12, 杨星科采; 1♂ 1♀, 海南岛尖峰岭, 1984. III. 22, 宋士美采; 1♀, 广西金秀银杉站 1 100 m, 1999. V. 10, 李文柱采。

分布: 中国(湖北、湖南、广西、海南); 越南^[15]。

讨论: 此种原始描述简单, 主要是颜色的区别, 鞘翅蓝紫色, 具金属光泽, 前胸背板红褐色, 头部黑色, 此种体形较大与分布于中国的其他种有较大差异。

致谢: 中国科学院北京动物研究所和中国科学院上海昆虫博物馆为本研究提供了针插标本, 在此表示诚挚感谢。

参考文献:

- [1] 陈斌. 中国伪叶甲科分类研究[D]. 重庆: 西南农业大学, 1995: 1-138.
CHEN B. Systematic study on the Chinese Lagriidae(Coleoptera)[D]. Chongqing: Southwest Agricultural University, 1995: 1-138.
- [2] BORCHMANN F. Coleoptera Heteromera Fam. Lagriidae [M]//WYTSMAN P. Genera Insectorum, Fasc 204. Brussels: Louis Desmet-Verteneuil, 1936.
- [3] WATT J C. A revised subfamily classification of Tenebrionidae (Coleoptera)[J]. New Zealand Journal of Zoology, 1974, 1(4): 381-452.
- [4] BOUCHARD P, LAWRENCE J F, DAVIES A E, et al. Synoptic classification of the world Tenebrionidae (Insecta: Coleoptera) with a review of family-groupnames[J]. Annales Zoologici, 2005, 55: 499-530.
- [5] MERKL O. Lagriini[M]//LÖBL I, SMETANA A. Cata-

- logue of Palaearctic Coleoptera. Denmark; Apollo Books, 2008; 113-118.
- [6] PIC M. Coleopteres divers du Tonkin et de l' Indo-Chine [J]. Melanges Exotico-Entomologiques, 1914, 9: 2-20.
- [7] MERKL O. *Donaciolagria malgorzatae* sp. nov. from Indochina, and new records of the genus (Coleoptera: Tenebrionidae: Lagriini) [J]. Annales Zoologici, 2011, 61 (2): 361-366.
- [8] MERKL O. On taxonomy, nomenclature, and distribution of some Palaearctic Lagriini, with description of a new species from Taiwan (Coleoptera: Tenebrionidae) [J]. Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae, 2004, 50 (4): 283-305.
- [9] MERKL O. Notes on Asian Lagriini, with description of *Cerogria gozmanyi* sp. n. (Coleoptera: Tenebrionidae) [J]. Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae, 2007, 53 (Suppl. 1): 255-272.
- [10] MERKL O. A new species of *Exostira* Borchmann from Borneo, with comments on the genus (Coleoptera: Tenebrionidae: Lagriini) [J]. Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae, 1999, 45 (3): 199-205.
- [11] LEWIS G. On the Cistelidae and other heteromorous species of Japan [J]. Annals and Magazine of Natural History, 1895, 15 (6): 250-278.
- [12] MASUMOTO K. A study of the Japanese Lagriidae [J]. Entomological Review of Japan, 1987, 42: 37-60.
- [13] BORCHMANN F. Die Lagriinae (Unterfamilie der Lagriidae.) [J]. Archiv für Naturgeschichte, 1915, 81A: 46-188.
- [14] KONO H. Die Lagriiden Japans (Col.) [J]. Insecta Matsumurana, 1929, 4: 25-35.
- [15] BORCHMANN F. Die Lagriiden-Fauna der Philippinen [J]. Philippine Journal of Science, 1930, 41: 403-533.

Animal Sciences

Five Newly Recorded Species of Statirinae from China

LIANG Zhihong, CHEN Bin

(Chongqing Key Laboratory of Vector Insects, Institute of Entomology and Molecular Biology, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract: [Purposes] To update the species and distribution of Statirinae from China. [Methods] These specimens of Statirinae were identified by the traditional morphological classification method using microscope in reference of related literature and specimens. [Findings] Five species of Statirinae, namely *Donaciolagria impressipennis* Pic, 1914, *Exostira bisbimaculata* Pic, 1935, *Macrolagria fujisana* Lewis, 1895, *Macrolagria robusticeps* (Lewis, 1895) and *Sora purpureipennis* Borchmann, 1930, were newly recorded from China. The present paper provides the detailed description, and photographs of the whole-body adults and male aedeagus of these five new record species. The distributions all over China are also updated for these five species. [Conclusions] The work is of significance for further understanding of the taxonomy and biogeography of the subfamily, and also provide some help for better utilization of the subfamily resources.

Keywords: Statirinae; Lagriidae; Tenebrionoidea; Coleoptera; new record; China

(责任编辑 方 兴)

沟伪叶甲属及其两个中国新纪录种记述*

吴涛, 陈斌

(重庆师范大学昆虫与分子生物学研究所 重庆市媒介昆虫重点实验室, 重庆 401331)

摘要:【目的】记述沟伪叶甲属(*Bothynogria* Borchmann, 1915), 补充该属中国种类及分布情况。【方法】运用形态分类鉴定法, 查阅相关文献, 在体式解剖镜下进行标本鉴定与雄性外生殖器解剖。采用基恩士超景深三维显微摄像系统(Keynece VHX-5000)拍摄照片。【结果】鉴定出异色沟伪叶甲(*Bothynogria bicolor* (Kollar et Redtenbacher, 1848))和印度沟伪叶甲(*Bothynogria meghalayana* Merkl, 1990)为中国新纪录种。沟伪叶甲属已知5种分布于中国, 对它们进行了详细的描述, 提供了整体图、局部特征图及雄性外生殖器图。编制了世界沟伪叶甲属已知6种的分种检索表。【结论】沟伪叶甲属世界已知6种, 在中国分布已知5种, 分别为异色沟伪叶甲、齿沟伪叶甲(*Bothynogria calcarata* Borchmann, 1915)、喜马拉雅沟伪叶甲(*Bothynogria himalayana* Borchmann, 1936)、印度沟伪叶甲和红胸沟伪叶甲(*Bothynogria ruficollis* (Hope, 1831))。【关键词】拟步甲科; 伪叶甲亚科; 沟伪叶甲属; 新纪录种; 分类; 检索表

中图分类号: Q969.498.6

文献标志码: A

文章编号: 1672-6693(2019)04-0031-05

沟伪叶甲属(*Bothynogria*)由 Borchmann 于 1915 年建立, 模式种为齿沟伪叶甲(*Bothynogria calcarata*, Borchmann, 1915), 描述于中国青岛胶州湾, 隶属于鞘翅目(Coleoptera)拟步甲总科(Tenebrionidea)伪叶甲科(Lagriidae)伪叶甲亚科(Lagriinae)。该属建立后, Borchmann 于 1936 年记述了喜马拉雅沟伪叶甲(*Bothynogria himalayana*)^[3], 然而之后 Borchmann^[4]和 Masumoto^[11]均未提到这一物种。1990 年, Merkl^[13]将异色沟伪叶甲(*Lagria bicolor* Kollar et Redtenbacher, 1848)和 *Lagria ruficollis* Hope, 1831 移入该属, 并将 *Cerogria ruficollis* Borchmann, 1936 年作为红胸沟伪叶甲(*Bothynogria ruficollis* (Hope, 1831))的同物异名, 同时记述了印度沟伪叶甲(*Bothynogria meghalayana*)和不丹沟伪叶甲(*Bothynogria bhutanica*)这两个新种。《福建昆虫志》则记述了齿沟伪叶甲分布于福建、四川、广西和云南, 红胸沟伪叶甲分布于福建和尼泊尔^[7]。

本研究对伪叶甲亚科进行了分类学研究, 发现了沟伪叶甲属两个中国新纪录种。到目前为止, 世界沟伪叶甲属已知 6 种, 在中国分布已知 5 种。本研究对沟伪叶甲属下每个种进行了详细的描述, 提供了该属模式种齿沟伪叶甲的生境图(封二彩图 1)以及沟伪叶甲属中国分布种的成虫背面和腹面观、触角、胫节以及雄性外生殖器高清图(封二彩图 2, 封三彩图 3~6), 编制并更新了中国沟伪叶甲属已知种类检索表, 为促进和完善中国沟伪叶甲属乃至伪叶甲亚科分类研究与生物地理学研究提供参考。

1 材料与方法

共检视了 38 头成虫针插标本, 相关标本保存于重庆师范大学昆虫标本馆(CQNU)和中国科学院动物研究所(IZCAS)。标本观察与描述、雄性外生殖器的解剖均在 Olympus SZ61 体式解剖镜下进行。标本整体图、局部特征图及生殖器图均在基恩士超景深三维显微摄像系统(Keynece VHX-5000)拍摄并自动合成, 测量与比例尺也均在 Keynece VHX-5000 系统中完成。所有图片均使用 Adobe Photoshop SC6 软件进行处理。

2 分类

2.1 沟伪叶甲属

拉丁学名: *Bothynogria* Borchmann, 1915: 128^[2]; Borchmann, 1936: 115^[3]; Merkl, 1990: 279-294^[13], 2008:

* 收稿日期: 2019-03-21 修回日期: 2019-04-25 网络出版时间: 2019-07-15 12:30 2019-05-09 19:30

资助项目: 科学技术部基础性工作专项(No. 2015FY210300); 国家自然科学基金(No. 31672363; No. 31872262); 广西科技重大项目(No. GKAA17129002)

第一作者简介: 吴涛, 女, 研究方向为昆虫学, E-mail: wutao0929@outlook.com; 通信作者: 陈斌, 男, 教授, 博士, E-mail: c_bin@hotmail.com
网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20190509.1930.030.html>

113^[10]。本属模式种:齿沟伪叶甲(*Bothynogria calcarata* Borchmann, 1915^[2], by original monotypy)。

本属鉴别特征:体延长,棕色或棕黑色。头近圆形,额侧突基瘤隆起;雄性触角第 11 节稍短于该节前 3 节长度之和,触角端节腹面凹陷,具内脊线;复眼较大,肾形。前胸背板近方形或稍横形,有 3 个深浅不一的压痕。小盾片三角形或舌型。鞘翅两端近平行,稍隆凸,刻点无规律,刻点间区呈横皱纹状。腹部简单,被较小的刻点,第 V 可见腹板顶端圆。足具复杂的性别特征,雄性中、后足胫节内缘锯齿状,中足胫节具突齿或无,后足胫节具有 1 个齿突。阳茎简单,具典型的阳基侧突。性二型,雌性与雄性相似,但雌性体型更大,鞘翅更隆凸,额侧突基瘤不发达,复眼较小且两眼间距更大,触角第 11 节短于该节前 2 节长度之和,足简单,胫节无锯齿突起。

注:沟伪叶甲属区别于伪叶甲亚科其他属的特征是:前胸背板横形,有 3 个深浅不一的压痕;雄性中、后足胫节具小齿状突起,后足胫节中部具 1 个齿突。

本属分布:中国、印度、不丹、尼泊尔。本属模式种的典型生境:见封二彩图 1a, b。

2.2 分种检索表

沟伪叶甲属(*Bothynogria* Borchmann, 1915)分种检索表

- | | |
|--|---|
| 1. 前胸背板横行,具 3 个清晰压痕,中央沟状,两侧肾形 | 2 |
| - 前胸背板稍横,压痕浅 | 5 |
| 2. 中足胫节具齿突 | 3 |
| - 中足胫节不具齿突 | 4 |
| 3. 复眼大,两眼间距是复眼横径的 1/2;中、后足胫节齿突窄而尖锐 | 异色沟伪叶甲(<i>B. bicolor</i> (Kollar et Redtenbacher, 1848)) |
| - 复眼相对小,两眼间距是复眼横径的 1.2 倍;中、后足胫节齿突宽而钝 | 不丹沟伪叶甲(<i>B. bhutanica</i> Merkl, 1990) |
| 4. 触角第 11 节腹面内缘具明显的小齿 | 齿沟伪叶甲(<i>B. calcarata</i> Borchmann, 1915) |
| - 触角第 11 节内缘不具小齿 | 印度沟伪叶甲(<i>B. meghalayana</i> Merkl, 1990) |
| 5. 鞘翅茸毛长而半直立;两眼间距等于复眼横径;后足胫节无齿状突起;阳基侧突弯曲 | 喜马沟伪叶甲(<i>B. himalayana</i> Borchmann, 1936) |
| - 鞘翅茸毛短而匍匐;两眼间距是复眼横径的 1.25 倍;中足胫节具齿突;阳基侧突直 | 红胸沟伪叶甲(<i>B. ruficollis</i> (Hope, 1831)) |

2.3 异色沟伪叶甲(中国新纪录种)

拉丁学名:*Lagria bicolor* Kollar et Redtenbacher, 1848:534^[12]; Borchmann, 1910^[1]:7, 1915:87^[2] (as synonym of *Lagria ruficollis*), 1936:137^[3] (as synonym of *Cerogria ruficollis*)。模式种产地:未知。

特征:1) 雄性:体长 9.66 mm,体宽 3.6 mm(封二彩图 2a, b)。头部复眼处与前胸背板最宽处等宽;额侧突基瘤稍隆起;额唇基沟长弧形;唇基前缘稍凹陷,上唇心形,唇基与上唇被长刚毛;下颚须末节呈斧形;额不平坦,刻点粗密;复眼大,占满整个头部,复眼直径是两眼间距的 2 倍(0.6 mm : 0.3 mm);触角向后超过鞘翅肩部,端节略短于前 3 节长度之和(封三彩图 4a)。前胸背板宽略大于长(1.7 mm : 1.3 mm),最大宽度在中部稍前处;具 3 个深浅不一的压痕,中间压痕较浅,两侧压痕较深;前后缘清晰可见;刻点粗大,具褶皱,刻点直径是刻点间距的 3~4 倍。鞘翅不隆凸,两侧近平行,被后曲的短茸毛;刻点粗,刻点间距是刻点直径的 0.8~1.3 倍,刻点间区无毛,光滑;中胸小盾片与鞘翅颜色一致;鞘翅缝合线明显。腹部具细小刻点;被白色茸毛;中胸腹板、后胸腹板、中胸后侧片、中胸前侧片、后胸后侧片、后胸前侧片和第 I~V 可见腹板呈棕红色。足粗壮,中足胫节直,内缘具齿,齿突位于齿列之首,窄而尖锐,齿突位于中部靠后;后足胫节直,内缘锯齿状,齿突位于齿列之首,窄而尖锐,齿突位于中部之前(封三彩图 5a)。阳基侧突窄,矛尖状,末端圆形,侧面稍弯曲(封三彩图 6a)。

2) 雌性:体较雄性粗壮,体长 10.6 mm(封二彩图 2c, d);前胸背板两侧具肾形压痕,中部压痕较浅;复眼占头部比例相对较小,复眼横径约等于两眼间距(0.57 mm : 0.54 mm);触角第 11 节与该节前两节长度之和相等;足较粗壮,中足与后足胫节内缘不具齿。

讨论:Borchmann^[1-3]将 *B. bicolor* 作为 *B. rufivollis* 的同物异名。Merkl^[13]观察了模式标本,发现这两个种在外观与雄性外生殖器上均不同。异色沟伪叶甲区别于该属其他种的特征:后足胫节内缘中部具齿突,齿突均位于齿列之首,齿突窄而尖锐;雄性复眼大,几欲占满整个头部,复眼直径约为复眼间距的 2 倍。

注:种本名学名 *bicolor*,意为双色的,中文名根据学名新拟定。

检视标本:1♂1♀(IZCAS),西藏墨脱县背崩乡格林村,2016. VI. 19, 930 m, 北纬 29°14'56"、东经 95°11'20", 梁红斌采。分布:中国(西藏)、尼泊尔、印度。

2.4 齿沟伪叶甲

拉丁学名:*Bothynogria calcarata* Borchmann, 1915: 129^[2]; 1941: 22^[4]; Masumoto, 1988: 47^[11]; Merkl, 1990: 283-284^[13], 1991: 9^[14]; Chen, 1995: 63-65^[6]; Merkl, 2008: 113^[10]。模式种产地:中国青岛胶州湾。

特征:1) 雄性:体长 7.9~8.4 mm; 体宽 3.3~3.4 mm(封二彩图 2e, f); 头部复眼处与前胸背板等宽; 额侧突基瘤光亮, 隆起与复眼等高; 额唇基沟深呈长弧形; 唇基甚窄于上唇, 前缘稍凹陷; 上唇心形; 唇基与上唇具刚毛; 下颚须粗壮, 呈斧形; 额不平坦, 刻点粗密具刚毛; 复眼大, 隆凸, 复眼横径约为眼间距的 1.5 倍; 触角伸达鞘翅肩部, 第 3~10 节逐渐变粗变短, 第 11 节长度稍短于前 3 节之和, 末节腹面凹, 凹面内缘具不规则的小齿(封三彩图 4b)。前胸背板近方形, 略隆凸, 有 3 个深浅不一的压痕, 中间纵沟状, 两侧的肾形, 中间稍前最宽; 前后缘清晰, 前胸背板刻点粗大, 大小不均一, 两侧甚密, 刻点直径为 1~2 个刻点间距。鞘翅稍隆凸, 向后稍变宽; 被后曲短的茸毛, 刻点粗, 刻点间距为 2 个刻点直径; 肩角粗壮, 向前隆起, 具皱褶; 背观鞘翅缘折仅肩部不可见; 中胸小盾片与鞘翅颜色一致; 鞘翅缝合线明显。腹部常形, 第 I~V 可见腹板浅黄色至褐红色, 具细小刻点, 被白色茸毛; 后胸腹板高于第 I~V 可见腹板, 颜色更深, 呈黑褐色; 中胸前侧片三角形, 红褐色。足细长, 具有浅黄色茸毛; 腿节粗壮, 中足胫节内缘锯齿状, 缺乏齿突, 后足胫节内缘锯齿状, 齿突位于胫节中部, 且在齿列之首(封三彩图 5b)。阳基侧突矛尖状, 顶端稍圆, 侧面观近乎直(封三彩图 6b)。

2) 雌性:体较粗壮(封二彩图 2g, h); 触角、头部、前胸背板以及足呈红褐色; 鞘翅呈浅褐色; 额侧突基瘤延伸至复眼处; 复眼占头部比例相对小; 触角第 11 节内缘无锯齿状凸起, 末节与前 2 节长度之和相等。

讨论:齿沟伪叶甲区别于该属其他种的特征:雄性触角末节内缘锯齿状; 前胸背板方形, 刻痕深。

检视标本:8♂4♀(CQNU), 云南高黎贡山林家铺, 2011. VII. 15, 周勇采; 1♂2♀(CQNU), 云南腾冲来凤山公园, 2011. VII. 12, 周勇、周鑫采; 1♂(CQNU), 重庆市江津四面山, 2016. VI, 本科实习组采。分布:中国(湖北、江西、湖南、福建、广西、台湾、重庆、四川、贵州、云南)^[10]。

2.5 喜马拉雅伪叶甲

拉丁学名:*Bothynogria himalayana* Borchmann, 1936: 116^[3]; Merkl, 1990: 286-287^[13], 1991: 9^[14]。模式种产地:喜马拉雅山脉。

特征:1) 雄性:体长 8.4 mm, 体宽 3.4 mm(封二彩图 2i, j)。头部复眼处略窄于前胸背板; 额侧突基瘤光亮, 隆起与复眼等高; 额唇基沟清晰, 呈长弧形; 唇基、上唇前缘均凹陷; 下颚须粗壮; 额极不平坦, 具“U”型压痕, 额刻点相对细密; 复眼大, 两眼间距与复眼横径相等; 触角相对长, 第 1 节瘤状, 第 2 节短小, 从第 4 节至 10 节逐渐变短变粗, 第 10 节近方形, 第 11 节长度稍短于前 3 节之和, 端节腹面具内脊(封三彩图 4c)。前胸背板宽稍大于长, 中部最宽, 压痕甚浅; 刻点粗密, 刻点间距为 1.5~3 个刻点直径, 边缘刻点更密集。鞘翅扁平, 两侧近平行, 鞘翅长宽比例为 2(7.44 mm : 3.72 mm), 刻点粗大, 且密集, 刻点间距约为 2 个刻点直径; 鞘翅缝合线更清晰可见; 中胸小盾片舌型; 鞘翅茸毛相对长, 半直立, 鞘翅边缘茸毛更密集。腹部常形, 第 1~5 可见腹板呈棕色, 具细小的刻点, 第 5 可见腹板明显; 后胸腹板高于第 1~5 可见腹板, 呈黑褐色, 具半直立的黄色茸毛。足粗壮, 中足胫节直, 内缘呈锯齿状, 小齿状凸起大小近相等, 缺乏齿突; 后足胫节直, 胫节内缘中部稍后齿状凸起, 突齿位于齿列之首(封三彩图 5c)。阳基侧突两边近平行, 向末端渐收敛, 尖端钝圆, 侧面稍呈弯曲状的(封三彩图 6c)。

2) 雌性:体型较大, 体长 9.6~10.1 mm, 体宽 4.0~4.2 mm(封二彩图 2k, l); 体色较浅; 鞘翅向后方膨大, 呈浅黄色; 头与前胸背板颜色较深, 呈棕黄色; 复眼小, 两眼间距是复眼直径的 1.5(0.79 mm : 0.5 mm) 倍; 触角第 11 节长度等于前 2 节之和; 腹部较雄性腹部大, 稍隆起, 呈棕红色; 足相对较短。

讨论:喜马拉雅伪叶甲与齿沟伪叶甲相似, 但前者触角第 11 节内缘不具小齿。

检视标本:3♂8♀(CQNU), 尼泊尔加德满都, 2013. VII. 24, 2 038 m, 北纬 27°41'24"、东经 85°31'12", 周勇采。分布:中国(西藏); 印度, 尼泊尔。

2.6 印度沟伪叶甲(中国新纪录种)

拉丁学名:*Bothynogria meghalayana* Merkl, 1990: 284-285^[13]。模式种产地:印度。

特征:1) 雄性:体长 8.4 mm, 体宽 3.4 mm(封三彩图 3a, b); 头部复眼处略窄于前胸背板最宽处; 上唇前缘凹陷, 唇基横行, 顶端微凹, 均被稀疏的白色直立刚毛; 额唇基沟长弧形; 额侧突基瘤隆起, 光亮; 额不平坦, 具粗大的刻点; 复眼大, 复眼横径大于两眼间距, 复眼横径是两眼间距的 1.3(0.52 mm : 0.4 mm) 倍; 触角相对较短,

第 8,9 节长略大于宽,第 10 节近方形,触角末节与该节前 3 节长度之和相等,末节内缘具有脊线(封三彩图 4d)。前胸背板长 0.97 mm;宽 1.5 mm;长大于宽;最大宽度处在中部稍前;具 3 个明显的坑,两侧坑呈肾形,中域沟长而深;刻点大,刻点直径约刻点间距的 2 倍;中域沟附近刻点相对稀疏;两侧刻点近乎相连;前后缘清晰可见,后缘基部具有长弧形浅沟。鞘翅稍平坦,两边近平行;长与最大宽度比是 1.82 (6.2 mm : 3.4 mm);刻点细小,刻点间距略等于刻点直径,间区平坦,无粗大皱纹,向两侧微隆凸;被毛稀少,短而弯曲。足粗壮,中足胫节内缘呈锯齿状,没有齿突;后足胫节略向外弯曲,内缘具细小的齿,齿突后具一排细小的齿,齿突位于中部稍前(封三彩图 5d)。阳基侧突两边近平行的,末端尖锐,腹侧面稍弯曲(封三彩图 6d)。

2) 雌性:体较宽,颜色与雄性一样(封三彩图 3c,d);复眼直径是两眼间距的 1.7 倍;触角第 11 节长度等于该节前 2 节长度之和;鞘翅刻点间距约为刻点直径的 2.5~3 倍,中间刻点较密。

讨论:印度沟伪叶甲与齿沟伪叶甲相似,但是前者雄性触角 11 节内缘不具有细齿。

附注:种本名学名 *meghalayana*,意为印度亚邦,属印度东北的一邦,中文名根据学名新拟定。

检视标本:1♂(IZCAS),广东始兴县车八岭保护区仙人洞,508 m,2008. VII. 26D,北纬 24°43'48"、东经 114°12'09",梁红斌采。1♀(IZCAS),广东始兴县车八岭保护区车八岭村,590 m,2008. VII. 24D,北纬 24°40'48"、东经 114°11'24",梁红斌采。分布:中国(广东);印度。

2.7 红胸沟伪叶甲

拉丁学名:*Lagria ruficollis* Hope,1831:32^[9];Chujo,1966:549^[8]。*Cerogria ruficollis* Borchmann,1936:137^[3],1941:1^[4]。*Bothynogria ruficollis* Merkl,1990:287-289^[13],1991:9^[14];Chen,1995:63-68^[6];2008:113^[10]。模式种产地:尼泊尔。

特征:1) 雄性:体长 8.4~9.4 mm,体宽 3.4~3.8 mm(封三彩图 3e,f)。头部复眼处略窄于前胸背板;额唇基沟清晰;唇基、上唇前缘均深凹,呈棕黑色,两侧向前倾斜;上颚发达,呈棕红色;下颚须粗壮呈斧形;额侧突基瘤隆起;额不平坦,刻点密;头顶隆起高于后颊;复眼相对小,前缘凹,两眼间距窄于复眼横径;触角较长,从第 3 节到第 10 节逐渐变粗变短,第 10 节近似方形,第 11 节长度长于前 2 节之和,但短于前 3 节之和,末节内缘具脊,腹面凹(封三彩图 4e)。前胸背板宽大于长,中间稍前最宽;不平坦,压痕浅;刻点大,刻点间距为 1~3 个刻点直径;前胸背板边缘刻点间距较小;前后缘清晰,后缘有粗糙饰边。鞘翅平坦,两侧近平行;刻点间区隆起,为 1~2.5 个刻点直径;肩角隆起;缘折向后逐渐变窄;茸毛短而稀疏,向后曲。腹部常形,第 I~V 可见腹板深褐色;刻点稀疏;被白色短茸毛;后胸腹板颜色较深,呈黑色,且高于可见腹板。足粗壮,腿节呈棒状;中足胫节内缘具齿,小齿向后方逐渐变宽,齿突位于齿列的末端;后足胫节稍向外方弯曲,内缘具粗齿,突齿之首位于后足胫节中央,齿列渐变细(封三彩图 5e)。阳基侧突宽,矛尖状的,顶端尖锐(封三彩图 6e)。

2) 雌性:体长 9.7~10.0 mm,体宽 3.7~4.0 mm(封三彩图 3g,h);体型较粗大,体褐色至黑色;足黑色;复眼较小,两眼间距是复眼横径的 2 倍;触角第 11 节短于前 2 节之和。

讨论:红胸沟伪叶甲区别于该属其他种的特征:复眼小,眼间距为复眼横径的 2 倍;雄性中足胫节齿突位于齿列末端;后足胫节内缘齿突粗大,位于胫节中部齿列之首。

检视标本:3♂4♀(CQNU),尼泊尔加德满都,2013. VII. 24,2038 m,周勇采。分布:中国(福建)^[7];尼泊尔。

2.8 不丹沟伪叶甲

拉丁学名:*Bothynogria bhutanica* Merkl,1990:292^[13],2008:113^[10]。模式种产地:不丹。

特征:1) 雄性:体长 9.1~9.3 mm,体延长;头、前胸背板和腹面棕红色;触角和足棕色,腿节基部色较浅,鞘翅棕黑色。头圆形,两眼间距是复眼横径的 1.2 倍;触角相对较长,触角第 11 节长度稍短于该节前 3 节之和。前胸背板宽大于长;最大宽度在基部;压痕浅;刻点大,刻点间距是 0.5~1 个刻点直径;鞘翅向后渐变宽;刻点深,刻点间距是 1~3 个刻点直径;茸毛短;足粗壮,中足胫节近乎直,内缘具小齿,齿突位于齿列之首。后足胫节内缘锯齿状,齿突位于齿列之首。阳基侧突宽,尖毛状,尖端钝圆,侧面观稍弯曲。

2) 雌性:未知。

检视标本:未见标本,相关描述来源于 Merkl^[13]的研究。分布:不丹。

致谢:衷心感谢中国科学院动物研究所梁红斌教授提供有关标本。

参考文献:

- [1] BORCHMANN F. Nilonidae, Othniidae, Aegialitidae, Lagriidae[M]//Junk W, Schenkling S. Coleopterorum Catalogus, Pars 3. Berlin; [s. n.], 1910; 1-32.
- [2] BORCHMANN F. Die Lagriie (Unterfamilie der Lagriidae) [J]. Archiv fuer Naturgeschichte Berlin, 1915, 81A(6): 46-186.
- [3] BORCHMANN F. Coleoptera Heteromera Fam. Lagriidae [M]. WYTSMAN P. Genera Insectorum Fasc 204, Brussels; Louis Desmet-Verteneuil, 1936; 1-561.
- [4] BORCHMANN F. Entomological results from the Swedish Expedition 1934 to Myanmar and British India [J]. Coleoptera. Lagriidae and Alleculidae. Gesammelt von Rene Malaise. Arkiv för Zoologi, 1941, 33A(9): 1-32.
- [5] BORCHMANN F. Über die von Herrn J. Lapperich in China Gesammelten Heteromeren [J]. Entomologische Blätter, 1941, 37: 22-29.
- [6] 陈斌. 中国伪叶甲科分类研究 [C]. 重庆: 西南农业大学, 1995.
CHEN B. Systematic study on the Chinese Lagriidae (Coleoptera) [C]. Chongqing: Southwest Agricultural University, 1995.
- [7] 黄邦侃. 福建昆虫志(第六卷) [M]. 福州: 福建科学技术出版社, 2002: 170-180.
- HUANG B K. Fauna of insects in Fujian province of China (vol. 6) [M]. Fuzhou: Fujian Science and Technology Press, 2002; 170-180.
- [8] CHUJO M. Coleoptera of East Nepal [J]. Journal of the College of Arts and Sciences China University, 1966, 4(4): 533-557.
- [9] HOPE F W. Synopsis of the new species of Nepal insects in the collection of Major General Hardwicke [M]. London: The Zoological Miscellany, 1831: 20-32.
- [10] MERKL I, SMETANA A. Catalogue of Palaearctic Coleoptera [M]. Denmark; Apollo Books, 2008; 113-118.
- [11] MASUMOTO K. A study of the Taiwanese Lagriidae [J]. Entomological Review of Japan, 1988, 43(1): 33-52.
- [12] KOLLAR V, REDTENBACHER L. Aufzählung und Beschreibung der von Freiherrn Carl v. Hügel auf seiner Reise durch Kaschmir und das Himalayagebirge gesammelten Insecten [M]. [S. l.]; [s. n.], 1848; 395-564.
- [13] MERKL O. A review of *Bothynogria* Borchmann Coleoptera Tenebrionidae Lagriini [J]. Acta Zoologica Hungarica, 1990, 36(3/4): 279-294.
- [14] MERKL O. Lagriini of the Nepal-Himalayas Coleoptera Tenebrionidae [J]. Stuttgarter Beitrage zur Naturkunde Serie A (Biologie), 1991, 470: 1-18.

Animal Sciences

A Review of *Bothynogria* and Descriptions of Two New Records Species of the Genus from China

WU Tao, CHEN Bin

(Chongqing Key Laboratory of Vector Insects, Institute of Entomology and Molecular Biology, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract: [Purposes] To record the system of the genus *Bothynogria* Borchmann, 1915 (Coleoptera: Tenebrionidae: Lagriinae) from China. [Methods] The traditional morphological classification based on morphological characters. Descriptions were made under a stereomicroscope (Olympus SZ61). Images were obtained using a Digital Microscopic System VHX-5000. The measurements and indices used throughout the descriptions were measured by the VHX-5000. [Findings] *Bothynogria* from China includes five species, of which *Bothynogria bicolor* (Kollar et Redtenbacher, 1848) and *Bothynogria meghalayana* Merkl, 1990 are two newly recorded from China. Photographs of the dorsal habitus, ventral view and illustrations of the male genitalia of those five species are provided. A key to the species of *Bothynogria* is given. [Conclusions] The genus *Bothynogria* includes six known species in the world, of which five species are from China. These five species are *B. bicolor*, *Bothynogria calcarata* Borchmann, 1915, *Bothynogria himalayana* Borchmann, 1936, *B. meghalayana*, and *Bothynogria ruficollis* (Hope, 1831).

Keywords: Tenebrionidae; Lagriinae; *Bothynogria*; new record; taxonomy; identification key

(责任编辑 方 兴)

中国扇螽属一新纪录种*

蒲徐波¹, 兰洪波², 于昕³

(1. 重庆师范大学图书馆, 重庆 401331; 2. 贵州茂兰国家级自然保护区管理局, 贵州 荔波 558400;
3. 重庆师范大学生命科学学院, 重庆 401331)

摘要:【目的】以形态分类学的方法探讨中国贵州荔波发现的蜻蜓目(Odonata)扇螽科(Platycnemididae)扇螽属(*Platycnemis* Burmeister, 1839)一标本的分类地位。【方法】将新发现的标本与中国已知的扇螽属种类进行比较形态学分析, 确定标本种类并进行必要的分类学纪录。【结果】鉴定出蜻蜓目扇螽科扇螽属一新纪录种, 即白足扇螽(*Platycnemis phasmovolans* Hämäläinen, 2003)。对该物种进行了详细的分类学描述, 同时讨论了中国扇螽属的分类学现状, 编制了扇螽属中国已知种的分类检索表。【结论】白足扇螽的新分布纪录的发现拓展了人们对该稀有物种的了解, 对该物种的保护具有重要价值。从进化的角度论证了本属雄性中后足胫节的特化起源于雄性间的争斗行为。

关键词: 蜻蜓目; 扇螽属; 新纪录种; 中国贵州

中图分类号: Q969

文献标志码: A

文章编号: 1672-6693(2019)04-0036-04

扇螽属(*Platycnemis* Burmeister, 1839)为蜻蜓目(Odonata)扇螽科(Platycnemididae)昆虫, 为扇螽科的模式属。扇螽属标志性特征为雄性中后足胫节处极度延展成叶状, 飞舞时象数把小扇子挥舞, 因此而得名“扇螽”。这一特征在现生蜻蜓中绝无仅有。本属物种为小型种类, 体色多蓝、绿色, 杂以黑色条纹, 常见于湖泊、池塘、缓流水体(如山间宽阔溪流、河流)等周边的灌草丛中。目前扇螽属世界纪录共 13 种^[1], 其中中国纪录共 2 种^[2], 即主要分布在中国北方以及华东地区的白扇螽(*Platycnemis foliacea* Selys, 1886)(封二彩图 1a)和中国南、北方均分布较为广泛的叶足扇螽(*Platycnemis phyllopoda* Djakonov, 1926)(封二彩图 1b)^[3]。2003 年 Hämäläinen 描述了发现于老挝 Bolikhamsay 省 Nakai Nam Theun 国家保护区北部地带的扇螽属新种 1 种, 即白足扇螽(*Platycnemis phasmovolans*); 它以雄性极其夸张的足胫节延展为特征, 是目前现生种类中“扇子”最大的种类^[4]。白足扇螽自首次报道后再无相关发现及研究。

位于中国贵州省荔波县的茂兰国家级自然保护区(后简称茂兰保护区)属中亚热带气候区, 拥有世界上相同地带区域内仅有的喀斯特原始森林; 该保护区也是喀斯特区原始森林分布面积最大的区域^[5]。茂兰保护区具有独特的地质条件, 因而成为了中国生物多样性最丰富的地区之一, 也为很多稀有的物种提供了生存空间。蜻蜓目昆虫是理想的生态环境指示生物, 因兼有水、陆生活史, 所以可同时适用于水、陆环境评价^[6]。多年以来, 茂兰保护区管理部门对辖区内的蜻蜓类群多样性调查十分关注, 而本文第二作者在一次巡视中偶然发现一种非常奇特、漂亮的豆娘(蜻蜓目均翅亚目统称), 经后期研究发现即 Hämäläinen 描述的白足扇螽^[4](封二彩图 1c)。为此, 本文将之增补为扇螽属的中国新纪录种, 并就该物种的特殊性连同本属其他中国分布种一并进行了讨论。

1 材料与方法

研究标本(1♂)被发现并拍摄于中国贵州省荔波县茂兰保护区, 拍摄时间为 2009 年 7 月 2 日。拍摄所用照相机型号为 Panasonic DMC-LX2, 拍摄参数为: 光圈 f/4.9, 曝光时间 1/200 s, 感光度 200, 焦距 25 mm。参考标本包括: 1) 白扇螽(2♂♂ 1♀, 河北省邢台市临城县三峰山, 2013-VII-11, 薛俊莉采; 2♂♂, 河南省辉县薄壁镇平甸

* 收稿日期: 2018-06-04 修回日期: 2019-04-10 网络出版时间: 2019-07-15 12:30

资助项目: 国家自然科学基金(No. 31572299); 国家科学技术部《动物志》编研项目(No. 2015FY210300); 重庆市自然科学基金(No. cstc2018jcyjAX0415)

第一作者简介: 蒲徐波, 女, 讲师, 研究方向为昆虫科普教育, E-mail: puxubo@163.com; 通信作者: 于昕, 男, 副教授, 博士, E-mail: lanny-summer@163.com

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20190715.1230.016.html>

村,2013-VII-21,张丹丽采;5♂♂2♀♀,天津蓟县八仙山,2014-VI-20,于昕采)。2)叶足扇螽(2♂♂2♀♀,天津城区姊妹湖,2005-VII-10,于昕采;3♂♂2♀♀,四川眉山尚义观音村,2013-VII-19,于昕、蒲徐波采;4♂♂2♀♀,安徽金寨元冲,2014-V-2,于昕采)。分类学特征鉴定参考于昕的检索表及相关描述^[2]。

2 结果

2.1 分类学描述

拉丁学名:白足扇螽(*Platycnemis phasmovolans* Hämäläinen, 2003)。

物种主要特征如下。

雄性:腹长(包括肛附器)31.5~32 mm,后翅长19~20 mm。

1) 头部:下唇白色,侧叶尖端黑色;上唇黑色,前唇基蓝色,后唇基浅蓝色;面部具一横宽浅蓝色条纹,与浅蓝色的后唇基相接形成位于面部的蓝色环带,且该面部条纹的中部于后唇基的上方处断开;上颚基部部分蓝色;头顶黑色,带金属光泽;侧单眼两旁有浅色的斑点,侧单眼后方,后头边缘呈现浅色的细线;触角黑色,仅第2节(梗节)顶端颜色较浅,第2节比第3节短。

2) 胸部:前胸黑色,侧面具浅蓝色条纹与合胸肩前条纹连贯;合胸黑色,具纵向浅蓝色条纹;肩前条纹细长,与前翅基部相连;合胸侧面中胸侧缝以下浅蓝色,沿后胸侧缝有一条较粗的黑条纹;合胸腹面整个浅蓝色;翅透明,翅痣棕褐色;前足基节白色,转节基部一半黑色,另一半白色,腿节仅端部约1/3处黑色,剩余部分全部白色;胫节和跗节黑色;中后足转节黑色,仅端部一点白色,基节、腿节和胫节全部白色,仅足刺为黑色,爪深棕色,中后足胫节强烈的横向延展。

3) 腹部:腹部黑色,分布着浅蓝色斑纹:S1腹面侧面均呈浅蓝色;S2腹面浅蓝色,侧面各有一点蓝色斑纹;S3到S6基部具浅蓝色基环,且从S3至S6逐步加大;S3到S5基部两侧隐约具浅蓝色的斑纹;S7到S9为黑色;S10几乎全部浅蓝色;尾须蓝白色,肛侧板尖端黑色。

雌性:腹长(包括肛附器)31 mm,后翅长20 mm。

1) 头胸和胸部:头部与胸部黑色,斑纹样式与雄性类似,但斑纹颜色为淡黄色;足部胫节不延展。基节与转节的色型与雄性类似,但雌性足为黄色;腿节外侧黑色,内侧黄色。胫节前部外侧全部黑色,胫节中部外侧棕色,胫节下部外侧基部颜色加深;翅痣较雄性的颜色浅。

2) 腹部:腹部黑色,侧面有浅色条纹,在活体样本中S1到S2浅色条纹为黄色,S3到S7浅色条纹为浅蓝色;S3到S6中浅色条纹在基部扩大,但并未成环;S10蓝白色,肛附器蓝白色。

评注:白足扇螽与扇螽属其他2个已知中国分布种在形态上比较容易区别:雄性白足扇螽中后足胫节延展程度更加剧烈,最宽处大于长度的1/3;叶足扇螽与白扇螽胫节最宽处约为长度的1/4;雄性白足扇螽中后足腿节全部呈白色,而白扇螽与叶足扇螽中后足腿节外侧均呈深色;白足扇螽沿后胸侧缝的条纹显著增宽,宽度从后胸侧缝开始向下几乎覆盖整个侧面,白扇螽与叶足扇螽则沿后胸侧缝均仅有1条较细的黑条纹;白足扇螽阳茎端叶末端自然伸直,无钩状结构^[3],白扇螽与叶足扇螽阳茎端叶(阳茎第3节鞭状突出物)末端均向后弯曲形成钩状。

2.2 扇螽属中国已知种检索表(雄性)

3个扇螽属中国已知种的检索表(雄性)如下:

- | | |
|---------------------------------|--------------------------------|
| 1. 中后足胫节最宽处大于长度的1/3 | 白足扇螽(<i>P. phasmovolans</i>) |
| - 中后足胫节最宽处约为长度的1/4 | 2 |
| 2. 尾须长度小于肛侧板的1/2,体表无白霜 | 叶足扇螽(<i>P. phyllopoda</i>) |
| - 尾须长度超过肛侧板的1/2,老熟个体体表被白霜 | 白扇螽(<i>P. foliacea</i>) |

3 讨论

白足扇螽于2011年被世界自然保护联盟(IUCN)红色名录收录,但该名录并未给出有关白足扇螽面临威胁的详细说明;其中原因是该物种被报道之后,至今没有更多的相关研究报告。红色名录中推测适宜生境的减少为该物种面临的主要威胁^[7]。本文报道的这一例新纪录使茂兰保护区成为迄今除模式产地以外唯一的白足扇

螳分布地。由此可见,白足扇螳是较为神秘的物种,它的生物、生态学信息仍鲜为人知,目前还无法评估该物种面临威胁的程度。但就该物种零星的发现纪录来看,虽然可能还有一些潜在的分布点会陆续被发现,但本种无疑不是广布类群,而且也应是稀有的狭生境类群,应该得到有效的保护^[8]。

雄性扇螳属物种极度延展的中后足胫节使之在飞行时足部像一簇在空中旋转灵动的小白扇子,十分引人注目。Zheng 等人^[9]在缅甸琥珀中发现了 3 枚同样存在足胫节极度延展的雄性豆娘化石,足胫节的延展程度更加夸张而且有斑纹,可见这种特征至少在 1 亿年前的恐龙时代就已形成。从化石琥珀发现的数量及化石种类足胫节更加延展的程度可以推断,扇螳类雄性足胫节极度延展这一特征较为古老,而且在早期更为盛行。现生蜻蜓中存在足胫节延展的类群不多,主要集中在扇螳科的扇螳属、狭扇螳属(*Copera*)以及隼螳科(*Chlorocyphidae*)的部分类群如圣鼻螳属(*Aristocypha*)、阳鼻螳属(*Heliocypha*)、*Platycyphas* 属等,其中以扇螳属最为典型^[10]。笔者同意 Zheng 等人^[9]的推测,即由于进化历程中鸟类等高效的捕食者的出现,使原有的扇螳类型面临巨大的被捕食的压力,从而向着足胫节延展小型化方向萎缩。根据观察,现在的扇螳属种类在飞行中展示“扇子舞”时仍然比较显眼,而且飞行的速度和机动性都受到影响,因而仍面临较高的被捕食风险。

Zheng 等人^[9]认为白垩纪琥珀中的豆娘主要将足胫节的显著延展这一特征用于求偶时“示爱”。然而根据对扇螳及其他蜻蜓类群的观察及研究,笔者认为这种夸张的结构应该主要用于或者说起源于雄性间的角逐及领地行为。现生蜻蜓中仅色螳科(*Calopterygidae*)和隼螳科的部分种类存在明显的以翅斑“示爱”的行为,而琥珀中的种类明显是扇螳科的类群。现生蜻蜓中几乎所有种类都存在雄性间的打斗及炫耀武力的行为。在豆娘中,几乎全部种类的雄性都是以特定的舞姿及夸张的第二性征来“吓”走对手,很少有真正的“肢体接触”,这一点被笔者自己的野外观察及一系列相关研究所证明^[11-13];而蜻蜓的交配则一律是粗暴的“野蛮”行为^[13-14]。可能也正因为如此,导致了明显的蜻蜓性二型现象,即:雄性体色更加艳丽以区别于雌性,从而避免不必要的“强行交配”中的损伤;部分“聪明”的雌性则模拟雄性的外表来减少自身的损伤。这方面的研究不胜枚举^[12,15-16]。

总而言之,在中国能发现白足扇螳这样美丽而稀有的蜻蜓种类,对于丰富中国蜻蜓多样性以及开拓更广阔的研究领域无疑都具有积极意义。

参考文献:

- [1] SCHORR M, PAULSON D. List of Odonata of the world [EB/OL]. [2017-12-29]. <https://www.pugetsound.edu/academics/academic-resources/slater-museum/biodiversity-resources/dragonflies/world-odonata-list2>.
- [2] 于昕. 中国蜻蜓目螳总科、丝螳总科分类学研究(蜻蜓目:均翅亚目)[D]. 天津:南开大学,2008.
YU X. A Taxonomic study on the superfamilies Coenagrionoidea and Lestoidea (Insecta: Odonata: Zygoptera) from China[D]. Tianjin: Nankai University, 2008.
- [3] 于昕. 蜻蜓学研究[EB/OL]. [2017-12-29]. http://www.china-odonata.top/odonata/w_taxo/tree.asp.
YU X. Odonata research[EB/OL]. [2017-12-29]. http://www.china-odonata.top/odonata/w_taxo/tree.asp.
- [4] HÄMÄLÄINEN M. *Platycnemis phasmovolans* sp. nov.: an extraordinary damselfly from Laos with notes on its East Asian congeners (Odonata: Platynemididae) [J]. Tombo, 2003, 46(1/2/3/4): 1-7.
- [5] 侯满福, 沈庆庚, 覃海宁. 贵州茂兰喀斯特原生性森林群落物种多样性特征[J]. 广西师范大学学报(自然科学版), 2011, 29(1): 60-65.
HOU M F, SHEN Q G, TAN H N. Species diversity character of original forest community in maolan karst, guizhou [J]. Journal of Guangxi Normal University (Natural Science Edition), 2011, 29(1): 60-65.
- [6] 于昕, 卜文俊, 朱琳. 应用蜻蜓目昆虫进行生态环境评价的研究进展[J]. 生态学杂志, 2012, 31(6): 1585-1590.
YU X, BU W J, ZHU L. Research advances in eco-environment assessment using dragonfly as a bioindicator[J]. Chinese Journal of Ecology, 2012, 31(6): 1585-1590.
- [7] HÄMÄLÄINEN M. *Platycnemis phasmovolans*. The IUCN red list of threatened species 2011: e. T190911A8840-307 [EB/OL]. [2017-12-27]. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2011-2.RLTS.T190911A8840307.en>.
- [8] PRIMACK R B, 马克平, 蒋志刚. 保护生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2014.
PRIMACK R B, MA K P, JIANG Z G. Essentials of conservation biology[M]. Beijing: Science Press, 2014.
- [9] ZHENG D, NEL A, JARZEMBOWSKI E A, et al. Extreme adaptations for probable visual courtship behaviour in a Cretaceous dancing damselfly [EB/OL]. [2017-12-27]. <https://www.nature.com/articles/srep44932>.
- [10] CORBET P S. Dragonflies: behavior and ecology of Odonata[M]. Ithaca: Cornell University Press, 1999.
- [11] CORDERO-RIVERA A, ZHANG H. Ethological uniqueness of a damselfly with no near relatives: the relevance of behaviour as part of biodiversity[J]. Animal Biodiversity

and Conservation, 2018, 41(1):161-174.

- [12] CÓRDOBA-AGUILAR A. Dragonflies and damselflies, model organisms for ecological and evolutionary research [M]. New York: Oxford University Press, 2008:290.
- [13] CORBET P S. Dragonflies behavior and ecology of Odonata [M]. Ithaca: Cornell University Press, 2004.
- [14] KHELIFA R. Faking death to avoid male coercion: extreme sexual conflict resolution in a dragonfly [J]. Ecology, 2017, 98:1724-1726.

- [15] FINCKE O M. Polymorphic signals of harassed female odonates and the males that learn them support a novel frequency-dependent model [J]. Animal Behaviour, 2004, 67:833-845.
- [16] ANDRÉS J A, SÁNCHEZ-GUILLÉN R A, CORDERO-RIVERA A. Evolution of female colour polymorphism in damselflies; testing the hypotheses [J]. Animal Behaviour, 2002, 63(4):677-685.

Animal Sciences

A New Record Species of the Genus *Platycnemis* Burmeister from China

PU Xubo¹, LAN Hongbo², YU Xin³

(1. Library, Chongqing Normal University, Chongqing 401331;

2. Administration of Guizhou Maolan National Nature Reserve, Libo Guizhou, 558400;

3. College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract: [Purposes] To investigate the taxonomy of a *Platycnemis* specimen from Libo, Guizhou. [Methods] To compare the specimen with those of Chinese recorded species with taxonomic methods and decide its species status. [Findings] It was confirmed that the newly found specimen was *Platycnemis phasmovolans* Hämäläinen, 2003 belonging to family Platycnemididae, which was the first record of the species in China. Detailed taxonomic description of *P. phasmovolans* and a key to Chinese species of *Platycnemis* were given. [Conclusions] The new record of *P. phasmovolans* from Guizhou extending our knowledge about this rare species thus is valuable to its conservation. From an evolutionary perspective, the extremely enlarged tibia of males in genus *Platycnemis* is derived from male conflicting.

Keywords: Odonata; *Platycnemis*; new recorded species; Guizhou province of China

(责任编辑 方 兴)

透明时间对草鱼脂肪组织和肌肉组织石蜡切片制作效果的影响*

李影, 唐蓓, 曾瑛
(重庆师范大学 生命科学学院, 重庆 401331)

摘要:【目的】探索不同透明时间对草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)脂肪组织和肌肉组织石蜡切片制作效果的影响,并筛选出最佳透明时间。【方法】应用石蜡切片技术对草鱼腹腔脂肪组织和背部肌肉组织进行切片,经苏木精-伊红染色后通过显微摄影来观察每类组织在不同透明时间的切片完整率和细胞完整性。【结果】草鱼腹腔脂肪组织在连续两次透明时间分别为3,1 min的条件下,切片完整率为88.33%,脂肪细胞形态完整且细胞膜无破碎;背部肌肉组织在连续两次透明时间分别为10,8 min的条件下,切片完整率为93.33%,肌细胞形态完整无破损,且肌间脂肪细胞界限明显。【结论】石蜡切片的制作效果取决于组织特性,草鱼脂肪组织和肌肉组织石蜡切片连续两次的最佳透明时间分别为3,1 min和10,8 min。

关键词:透明时间;脂肪组织;肌肉组织;石蜡切片;草鱼

中图分类号:Q2-3

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2019)04-0040-04

草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)是中国重要的淡水经济鱼类。目前,随着人工养殖的迅速发展,草鱼肌肉组织和腹腔肠系膜周围的脂肪积聚过多,直接影响了草鱼肉制品的品质和动物的生产力^[1-2]。因此,有必要从形态学的角度对草鱼脂肪组织与肌肉组织中细胞形态学特点进行研究。石蜡切片是组织形态学研究最常用的方法,它不仅被用于观察正常组织细胞的形态结构,而且也是病理学、医学等学科用以研究、观察及判断组织细胞形态变化的主要方法,并且该方法也已相当广泛地被用于其他许多学科领域的研究中。在石蜡切片制作过程中,鉴于不同物种不同组织的细胞组成和生理生化特点各异,因而对它们处理的方法不能一概而论,制作条件也会有所不同。尤其是脂肪组织中脂肪细胞体积较大,细胞内脂类含量多,单位体积内细胞数量少——若在该组织的石蜡切片制作过程中透明环节处理不当,易出现碎片、断片、脱片等情况,导致不能观察到组织细胞的真实形态。因此,有必要建立一种标准的鱼类脂肪组织和肌肉组织石蜡切片制作方法。本研究根据草鱼脂肪组织和肌肉组织的生理生化特点,经过反复实验,对影响草鱼脂肪组织和肌肉组织石蜡切片制作效果的关键环节即透明进行探索,优化和改进其中的某些过程,并筛选出最佳的脂肪组织切片和肌肉组织切片制作程序,从而为鱼类脂肪组织、肌肉组织形态学研究提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料和主要试剂

实验用健康草鱼1尾,体质量约1.5 kg,购于重庆市北碚区歇马养鱼场。多聚甲醛、乙醇、二甲苯、石蜡、苏木素、伊红、浓盐酸、冰醋酸、纯甘油、中性树胶等试剂均购自重庆塞米克生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 脂肪组织和肌肉组织石蜡切片的制作 以丁香酚对实验鱼进行麻醉,解剖获取背部肌肉组织和腹腔脂肪组织,以pH为7.2的磷酸盐缓冲液冲洗掉表面血液后,用眼科剪将上述组织剪成0.2 cm³左右小块,以质量分数为4%的多聚甲醛溶液固定24 h后冲洗,再将获取的各组织用体积分数由低到高的乙醇溶液进行连续脱水,然后在25℃条件下,以小鼠(*Mus musculus*)肝脏透明时间作对照^[3],依据脂肪组织和肌肉组织的细胞学特点按照透明时间递减原则对各组织进行透明。透明过程采用二甲苯二次透明法,即先将组织放在V_{二甲苯}:V_{乙醇}=

* 收稿日期:2017-10-26 修回日期:2019-05-20 网络出版时间:2019-07-15 12:30

资助项目:国家自然科学基金(No. 30800843);重庆市基础与前沿研究计划项目(No. cstc2016jcyjA1085)

第一作者简介:李影,女,教授,博士,研究方向为动物脂肪发育生物学,E-mail: xiaoying86@hotmail.com

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20190715.1230.010.html>

1:1的二甲苯-无水乙醇透明液中进行预透明,再以体积分数为100%的二甲苯进行透明。透明完成后将组织置于包埋皿内进行石蜡包埋,最后将每个组织进行连续横向切片,每个处理切取100张切片,切片厚度为4 μm。

1.2.2 苏木精-伊红(HE)染色后计算切片的完整率 按照常规石蜡切片染色方法^[3]在25℃条件下,对切片进行HE染色,然后肉眼观察结合Nikon Ds-Ril数码显微系统对切片进行观察和完整率统计。切片上组织连贯、无明显碎片,记为切片完好;切片上组织散在成碎片、切片不完整、显微镜下几乎见不到完整的细胞记为切片不完整。

每个处理随机计数60张切片,切片完整率计算公式为“切片完整率= $\frac{\text{完整切片个数}}{\text{总切片个数}} \times 100\%$ ”。

1.2.3 细胞形态观察 利用Nikon Ds-Ril数码显微系统对不同处理的各组织石蜡切片进行观察、拍照。

1.2.4 数据处理 各组石蜡切片均来自同一尾草鱼,实验的每个处理重复5次。采用SPSS 21.0软件对切片完整率进行单因素方差分析(One-Way ANOVA)和多重比较(LSD)。当 $p < 0.05$ 时,分析结果具有统计学意义。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 透明时间对脂肪组织和肌肉组织石蜡切片完整率的影响

由表1可知,透明时间长短对草鱼腹腔脂肪组织石蜡切片完整率有直接影响。在连续两次透明时间均为20 min条件下,切片的完整率很低,仅为3.33%。随着透明时间的减少,切片完整率逐渐增加,均高于对照处理,差异具有统计学意义($p < 0.05$)。特别地,在连续两次透明时间分别为3,1 min的条件下,切片完整率达88.33%,明显高于其他连续两次透明时间条件下的切片完整率,且差异具有统计学意义($p < 0.05$)。

表1 包埋前不同透明时间对草鱼腹腔脂肪组织和背部肌肉组织石蜡切片完整率的影响

Tab. 1 Effects of different transparent time on the slices' integrity rate of abdominal adipose tissue and muscle tissue in grass carp before embedded

处理	透明次序	透明试剂	腹腔脂肪组织		背部肌肉组织	
			透明时间/min	切片完整率/%	透明时间/min	切片完整率/%
对照	第1次	二甲苯-无水乙醇	20	3.33±1.67 ^a	20	15.00±5.27 ^a
	第2次	二甲苯	20		20	
处理1	第1次	二甲苯-无水乙醇	10	8.33±2.64 ^b	15	36.67±2.64 ^b
	第2次	二甲苯	10		10	
处理2	第1次	二甲苯-无水乙醇	5	25.00±3.03 ^c	10	93.33±4.25 ^c
	第2次	二甲苯	3		8	
处理3	第1次	二甲苯-无水乙醇	3	88.33±3.12 ^d	6	23.33±6.01 ^a
	第2次	二甲苯	1		4	

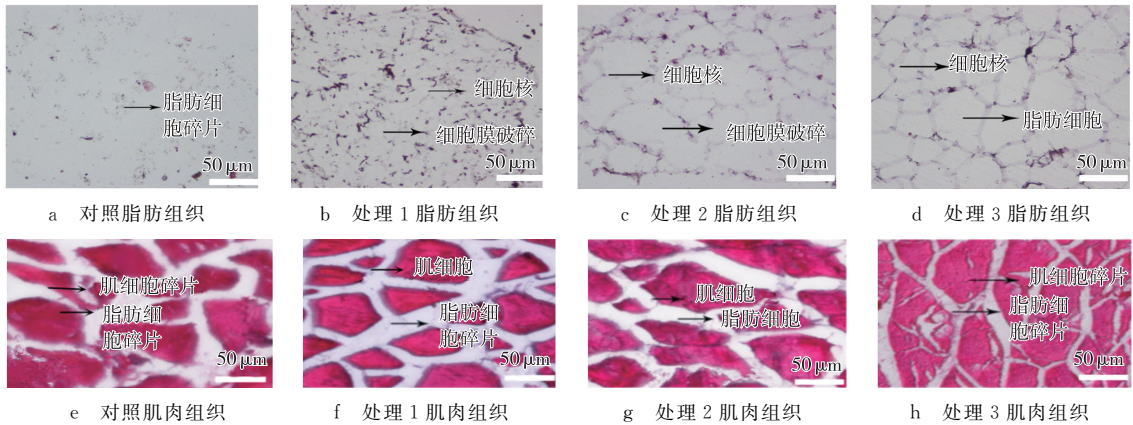
注:上标不同字母表示同列数据的差异具有统计学意义($p < 0.05$)

不同透明时间下,草鱼肌肉组织石蜡切片的完整率有所不同(表1)。在连续两次透明时间均为20 min条件下,切片完整率仅为15.00%。把连续两次透明时间分别减少为15,10 min后,切片的完整率有所增加,与前者相比差异具有统计学意义($p < 0.05$),但仍未达到理想值。当连续两次透明时间分别减少到10,8 min时,切片完整率达到了93.33%,远远高于连续两次透明时间均为20 min时的切片完整率,两者差异具有统计学意义($p < 0.05$)。然而在此基础上继续缩短两次透明时间分别为6,4 min时,切片完整率下降到23%,与对照相比差异无统计学意义。

2.2 透明时间对脂肪组织和肌肉组织石蜡切片细胞形态的影响

从图1a可以看出,整个视野内腹腔脂肪组织切片无完整的细胞存在,细胞结构被严重破坏;从图1b中则可见一定的细胞轮廓,但细胞形态不完整,大部分细胞仍以碎片形式存在;图1c显示脂肪细胞形态趋于完整,破碎的细胞较少;而图1d中所观察到的细胞形态完整且细胞膜无破碎。总之,草鱼腹腔肠系膜脂肪组织经石蜡切片HE染色后,脂肪细胞呈中空透明,被完整的细胞膜包绕,同时,细胞核多处于细胞膜边缘,被苏木精染成蓝色。

图 1e 显示,背部肌肉石蜡切片中肌肉细胞部分完整,部分出现碎片,且肌肉细胞间的脂肪细胞轮廓不清晰呈碎片状;图 1f 中的肌肉细胞形态完整,但该切片中极少见到完整的脂肪细胞,大部分脂肪细胞间无明显界限,细胞膜断裂,细胞以碎片形式存在;图 1g 则显示肌肉组织细胞形态完整无破损,且肌间脂肪细胞界限明显,大量完整的细胞轮廓清晰可见;而在图 1h 中,大部分肌肉细胞呈现出空洞,肌间脂肪细胞完全破碎。



注:对照及处理 1~3 对应的具体透明条件见表 1

图 1 草鱼腹腔脂肪组织和背部肌肉组织经不同透明时间所做横向切片在显微镜下的形态

Fig. 1 Morphology of abdominal tissue and muscle tissue treated at different transparent time and sliced transversely

3 讨论

石蜡切片的制作过程是由取材、固定、脱水、透明、透蜡、切片等一系列连续制作过程组成,其中透明环节是切片制作过程中关键的一步。本研究选用透明剂为二甲苯,该试剂折光率为 1.497,透明力强。运用二甲苯进行的组织透明必须在严密观察下进行——如果透明时间过短,则透明不彻底,石蜡难于浸入组织;透明时间过长,则组织硬化变脆,不易切出完整切片^[4]。在本研究中,让草鱼腹腔脂肪组织达到最佳透明效果的操作为:用二甲苯与乙醇混合液透明 3 min,然后用二甲苯透明 1 min。在上述透明条件下,切片的完整率达到了 88%,在显微镜下观察到的脂肪细胞形态完整且细胞膜无破碎,脂肪细胞呈中空透明,被完整的细胞膜包绕。背部肌肉组织透明的时间比腹腔脂肪组织更长。在用二甲苯与乙醇混合液透明 10 min 然后用二甲苯透明 8 min 的操作条件下,切片完整率达到了 93%,背部肌肉组织细胞形态完整无破损,且肌间脂肪细胞界限明显,大量完整的细胞轮廓清晰可见。另外,也有研究表明,绵羊(*Ovis aries*)卵巢组织透明时间为二甲苯与乙醇混合液 40 min、二甲苯 40 min^[5],大鼠(*Rattus norvegicus*)脑组织两次二甲苯的透明时间各为 10 min^[6],由此都得到了制作效果良好的组织切片。与其他研究者所得结果比较,本研究中草鱼脂肪组织的透明时间略短,这是由草鱼脂肪组织的特性所决定的。脂肪组织单位面积内的细胞数量少且体积大,细胞中含有大量的脂滴(主要是甘油三酯和胆固醇)^[7],二者都极易溶于二甲苯及乙醇,故透明时间相对较短。如果透明时间过长,甘油三酯完全溶解,组织变脆变硬,得到的切片就会有脱片和细胞膜破碎的情况。相对于草鱼腹腔脂肪组织,背部肌肉组织透明时间要更长才能取得较好的切片效果,但与肝脏组织、眼球晶状体组织相比较,该组织透明时间也有所缩短。这是因为草鱼背部肌肉组织中大部分为肌细胞,同时也存在一定量的肌间脂肪细胞。肌细胞中细胞质主要为肌浆,肌浆内含有丰富的肌纤维、线粒体,还含有少量颗粒状的糖原、肌红蛋白及高尔基体、内质网等。同样地,背部肌肉组织透明时间过长,会导致肌细胞出现空洞等问题,但透明时间过短则二甲苯不能完全地浸入组织,导致组织切片的折光率不佳。魏艳华等人^[8]以有脂肪组织的乳腺组织为实验材料,环保透明液 3 道各 5 min 制作出了完整切片。本研究与之差异之处在于,一方面是由于使用材料不同,本实验选用的是草鱼脂肪组织,而魏艳华等人用的是乳腺组织,组织中仅有部分脂肪细胞;另一方面,选用的透明试剂也有所不同,本实验选用的是二甲苯,而魏艳华等人用的是环保透明液。

总之,本研究利用石蜡切片和 HE 染色法对草鱼腹腔脂肪组织和背部肌肉组织进行了初步探索,通过大量实验,获得了较为满意的结果,成功地摸索出这两种组织石蜡切片 HE 染色的最佳方案,为草鱼腹腔脂肪细胞和背部肌肉细胞的进一步研究奠定了实验基础。

参考文献:

- [1] Food and Agriculture Organization of the United Nations. The state of world fisheries and aquaculture 2014. opportunities and challenges [EB/OL]. [2017-10-26]. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=XF2015007040>.
- [2] CRUZ-GARCIA L, SANCHEZ-GURMACHES J, BOU-RAOUI L, et al. Changes in adipocyte cell size, gene expression of lipid metabolism markers, and lipolytic responses induced by dietary fish oil replacement in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology, 2011, 158(4): 391-399.
- [3] 安利国, 邢维贤. 细胞生物学实验教程 [M]. 北京: 科学出版社, 2015.
AN L G, XING W X. Cell biology experiment [M]. Beijing: Science Press, 2015.
- [4] 杨媛媛, 夏羽, 李静, 等. 小鼠早期胚发育的全程组织切片观察 [J]. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 2011, 39(4): 14-18.
YANG Y Y, XIA Y, LI J, et al. The whole developmental process of mouse preimplantation embryonic oocyte with tissue section observation [J]. Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition), 2011, 39(4): 14-18.
- [5] 李海军, 于泊洋, 段云娇, 等. 绵羊卵丘-卵母细胞复合体石蜡切片技术的改良 [J]. 中国农业科学, 2017, 50(8): 1543-1550.
LI H J, YUB Y, DUAN Y J, et al. A modified paraffin-section technique for ovine cumulus-oocyte complexes [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2017, 50(8): 1543-1550.
- [6] 褚迎欣, 张树波, 高晓增, 等. 高质量大鼠脑组织连续石蜡切片的制作方法 [J]. 第二军医大学学报, 2016, 37(4): 527-528.
CHU Y X, ZHANG S B, GAO X Z, et al. Preparation of high-quality successive paraffin sections of rat brain tissue [J]. Academic Journal of Second Military Medical University, 2016, 37(4): 527-528.
- [7] WU J L, ZHANG J L, DU X X, et al. Evaluation of the distribution of adipose tissues in fish using magnetic resonance imaging (MRI) [J]. Aquaculture, 2015, 448: 112-122.
- [8] 魏艳华, 曾铮. 脂肪组织常规制片的改进 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2015(4): 467.
WEI Y H, ZENG Z. Modification of normal paraffin sections in adipose tissue [J]. Journal of Clinical Experimental Pathology, 2015(4): 467.

Animal Sciences

Effects of Different Transparent Time on the Paraffin Section's Quality of Abdominal Adipose Tissue and Muscle Tissue in Grass Carp

LI Ying, TANG Bei, ZENG Ying

(College of Life Science, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract: [Purposes] This study aimed to explore the effects of different transparent time on the paraffin section's quality of abdominal adipose tissues and back muscle tissue in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), and to screen the best transparent time to make paraffin section of the two kinds of tissues. [Methods] The abdominal adipose tissue and back muscle tissue of grass carp were sliced through the technology of paraffin section, and stained through HE staining. After that, the integrity rate of slices was calculated and the cell morphology was observed. [Findings] The best successive transparent time was 3, 1 min for adipose tissue of grass carp. Under such transparent conditions, the integrity rate of slices was 88.33%, and the intact membrane and adipocytes were observed by using microscopy. After two consecutive transparent time of 10, 8 min, the integrity rate of slices reached 93.33%, and muscle cells were intact without damaged, and the boundaries between intermuscular adipocytes was well-defined. [Conclusions] The making procedure of paraffin sections is determined by tissue characteristics. For the adipose tissue, the best consecutive transparent time is 3, 1 min, and for the muscle tissue, the best consecutive transparent time is 10, 8 min.

Keywords: transparent time; adipose tissue; muscle tissue; paraffin section; grass carp

(责任编辑 方 兴)

乙炔基雌二醇短期暴露损伤斑马鱼雌性成鱼渗透压调节*

刘智皓, 兰雪溶, 李英文

(重庆师范大学 生命科学学院 重庆市高校动物生物学重点实验室 重庆市高校生物活性物质工程研究中心, 重庆 401331)

摘要:【目的】考察乙炔基雌二醇(17 α -ethinylestradiol, EE2)短期暴露对斑马鱼(*Danio rerio*)雌性成鱼渗透压调节的影响。【方法】用10和100 ng·L⁻¹ EE2暴露性斑马鱼雌性成鱼7 d,同时设立不含EE2的对照组,然后测量斑马鱼体质量、体长并计算肥满度,测定全血量、血浆量和红细胞数量,观察鳃与肾的组织结构。【结果】与对照组相比,受100 ng·L⁻¹ EE2短期暴露处理后的斑马鱼雌性成鱼出现眼球突出、体表充血、鳞片竖起等症状,肥满度明显增加全血量和血浆量明显升高,红细胞数量则明显下降。此外,经EE2短期暴露处理的斑马鱼雌性成鱼的鳃出现上皮细胞水肿、血管扩张等症状,而肾脏则出现小管上皮水肿、多发性出血等症状。【结论】EE2短期暴露导致斑马鱼雌性成鱼渗透压调节出现明显失衡,对该鱼具有强烈的渗透压毒性。

关键词:乙炔基雌二醇;斑马鱼雌性;短期暴露;渗透压调节

中图分类号:Q492.5

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2019)04-0044-05

乙炔基雌二醇(17 α -ethinylestradiol, EE2)是一种广泛分布于地表水环境中的环境干扰物质(Endocrine disrupting chemicals),也是一种具有强烈雌激素效应的人工合成雌激素^[1]。许多研究发现,EE2对鱼类的性腺分化、发育、配子发生和繁殖都具有强烈毒性^[2-4]。经EE2处理的雄鱼出现明显雌性化,如卵黄蛋白(Vitellogenin)大量合成、性激素分泌失衡、性比改变、间性性腺、少精症等^[2-4]。此外,较高剂量的EE2短期暴露也能严重干扰雌性斑马鱼(*Danio rerio*)卵巢发育和卵子发生,导致早期和后期滤泡比例改变,后代存活率降低,甚至丧失生育能力^[5]。最近的研究发现,EE2所致卵巢发育障碍与下丘脑-垂体-性腺(Hypothalamic-pituitary-gonadal, HPG)轴功能异常及配子发生程序性失控密切相关^[6]。然而,EE2是否对鱼类具有渗透压毒性尚不清楚。为此,本研究用10和100 ng·L⁻¹的EE2对斑马鱼雌性成鱼进行了7 d暴露处理,并在处理结束后,对斑马鱼的形态结构、肥满度、全血量、血浆量、红细胞数量和主要的渗透压调节器官(鳃和肾)的组织结构进行了分析。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

EE2和助溶剂二甲基亚砜(DMSO)均购自Sigma公司。Eclipse 90i型光学显微镜购自Nikon公司, KD-3358型石蜡切片机购于科迪仪器设备有限公司。

1.2 实验设计与材料收集

实验用AB系120 d龄斑马鱼雌性成鱼购于国家斑马鱼资源中心(武汉),平均体质量为(0.52±0.08) g。实验鱼在循环养殖系统中驯养7 d,驯养水源为曝气除氯的自来水,水温控制在(28±0.5)℃,光照周期为14 h光照:10 h黑暗,硝酸盐、亚硝酸盐、硬度、pH等水质参数都控制在正常范围内,溶氧量大于或等于6.8 mg·L⁻¹。

通过预备实验发现,斑马鱼雌性在100 ng·L⁻¹的EE2中暴露10 d即可出现明显的病理学变化,并有个体死亡,因此将这一质量浓度的EE2用于本研究的高剂量暴露处理(EE2-high)。此外,本研究还设置1个水体中不含EE2但其中DMSO质量分数为0.05%的对照处理(Control)和1个水体中EE2质量浓度为10 ng·L⁻¹的低剂量暴露处理(EE2-low)。因此,随机取81尾雌性实验鱼并随机平均分为3组,进行上述处理。每个处理组

* 收稿日期:2018-06-28 修回日期:2019-05-07 网络出版时间:2019-07-15 12:30

资助项目:重庆市基础科学与前沿技术研究专项基金(No. cstc2016jcyjA1032);重庆市教育委员会科学技术研究项目(No. KJ130622;No. KJ1600308);重庆师范大学校级基金项目(No. 13XLZ08);淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室开放课题基金项目(No. FFRD-2015-02);淡水生态与生物技术国家重点实验室开放课题(No. 2019FB03)

第一作者简介:刘智皓,男,副教授,博士,研究方向为鱼类生理学,E-mail: minenut@163.com

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20190715.1230.012.html>

均设置3个平行缸(容积为60 L的玻璃缸,加曝气自来水50 L),每缸随机放入9尾实验鱼。处理期间,每日对实验鱼喂食3次、整体换水1次,并对水体持续充氧,维持水温和光照周期与处理前一致。7 d暴露处理结束后,从每缸中随机取4尾实验鱼,测定体质量(单位:g)、体长(单位:cm),并用公式“肥满度 $=\frac{\text{体质量}}{\text{体长}^3}$ ”计算肥满度(单位: $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$);再从每缸中随机取2尾实验鱼,取下鳃和肾脏,经波恩氏液固定后,用于组织学切片;最后从每缸中取剩下的3尾实验鱼,收集血液,用于全血量、血浆量和红细胞数量检测。

1.3 全血量、血浆量和红细胞数量测定

从每个处理组取实验鱼9尾,用 Babaei 等人^[7]描述的方法进行断尾,并用毛细采血管进行取血。取血后比较各处理组实验鱼全血量的差异。随后,将上述血液在4℃下按 $10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min,取出上清液,对比各组血浆体容量。每组另取3尾鱼的全血,用生理盐水稀释200倍后,用血细胞计数器在光镜下对红细胞数量(单位: $\text{个}\cdot\text{L}^{-1}$)进行统计。计算公式为“红细胞数量 $=5$ 个方格中红细胞总数 $\times 25/5\times 10\times 10^6\times 200$ ”,其中200为稀释倍数。

1.4 组织学观察

取实验鱼的鳃和肾脏,于波恩氏液中室温固定18 h。经梯度酒精脱水、二甲苯透明3次后,用60℃的石蜡在包埋盒中包埋。在切片机上对包埋材料进行切片,切片厚度为4 μm。切片经脱蜡、复水后,经苏木素-伊红(HE)染色后,在Eclipse 90i型光学显微镜上拍照。

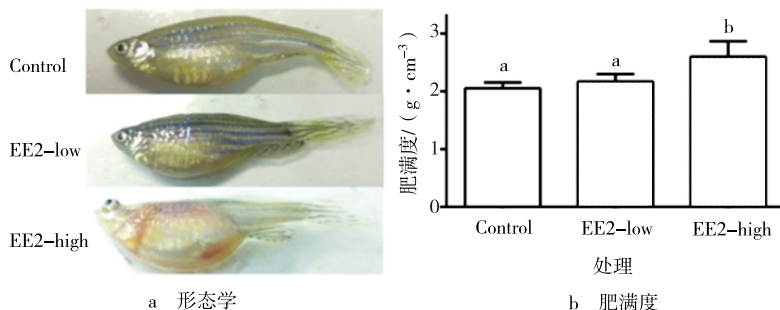
1.5 数据分析

实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示。用SPSS 13.0软件对实验数据进行单因素方差分析多重比较(Tukey法),当 $p<0.05$ 时,分析结果具有统计学意义。展示实验数据的柱形图用GraphPad Prism 6.0软件进行绘制。

2 结果

2.1 形态学和肥满度

图1a显示,经EE2短期暴露后,与Control组相比,EE2-low组实验鱼的形态没有明显变化,而EE2-high组实验鱼则出现了眼球突出、鳞片竖起、体表充血、毛细血管扩张等现象。研究结果还显示,EE2-low组与Control组的实验鱼肥满度不具有统计学意义上的差异,而EE2-high组较Control组而言,实验鱼肥满度明显上升,且与后者的差异具有统计学意义($p<0.05$)(图1b)。



注:样本量 $n=12$ 。不同字母表示处理组间数据差异具有统计学意义($p<0.05$),下同

图1 EE2暴露对斑马鱼雌性成鱼形态学和肥满度的影响

Fig. 1 The influence of EE2 exposure on morphology and condition factor of zebrafish females

2.2 全血量、血浆量和红细胞数量

从图2a可知,与Control组相比,两个EE2处理组的实验鱼全血量呈剂量依赖性增加,且与前者的差异具有统计学意义($p<0.05$),但两个EE2处理组实验鱼全血量不具有统计学意义上的差异。图2b则显示,EE2-low组与Control组实验鱼血浆量不具有统计学意义上的差异,而与Control组相比,EE2-high组实验鱼血浆量出现了统计学意义上的增加($p<0.05$)。此外由图2c可见,与Control组相比,EE2-low组实验鱼红细胞数量有下降的趋势,两组的这一指标差异不具有统计学意义,EE2-high组较Control组而言,实验鱼红细胞数量出现了统计学意义上的减少($p<0.05$)。

2.3 鳃和肾脏组织结构

EE2暴露处理7 d后,对实验鱼鳃的组织学观察结果显示:Control组实验鱼鳃丝排列整齐,鳃小片无损伤(图3a,d);EE2-low组实验鱼鳃则出现部分鳃小片脱落,上皮细胞肿胀的现象(图3b,e);EE2-high组斑马鱼上皮细胞肿胀、排列紊乱,并出现了毛细血管扩张的现象(图3c,f)。同时,对实验鱼肾脏的组织学观察结果表明:Control组实验鱼肾脏中肾小管和上皮细胞形态正常(图4a,d);经EE2-low处理的实验鱼肾脏中有少量局部出

血(图 4b,e);经 EE2-high 处理的实验鱼肾脏出现多发性出血,肾小管上皮细胞肿胀,坏死(图 4c,f)。

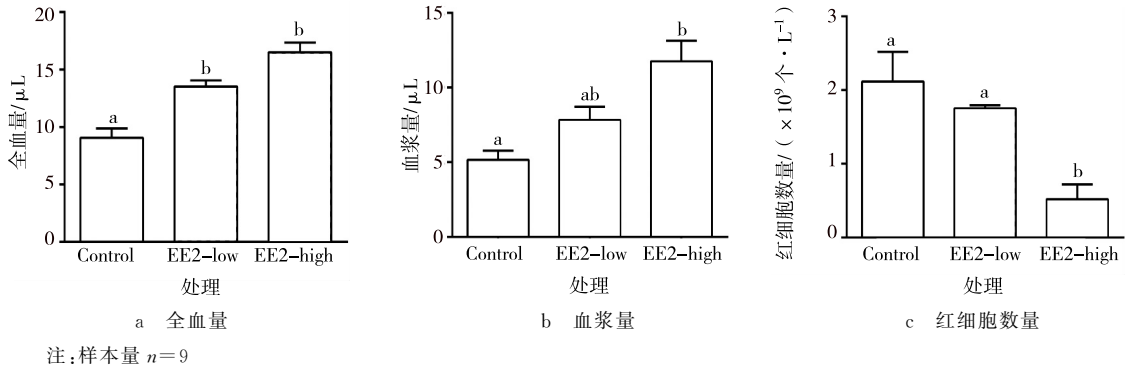


图 2 EE2 暴露对斑马鱼雌性成鱼全血量、血浆量和红细胞数量的影响

Fig. 2 The influence of EE2 exposure on blood, plasma, and red blood cell concentration volumes of zebrafish females

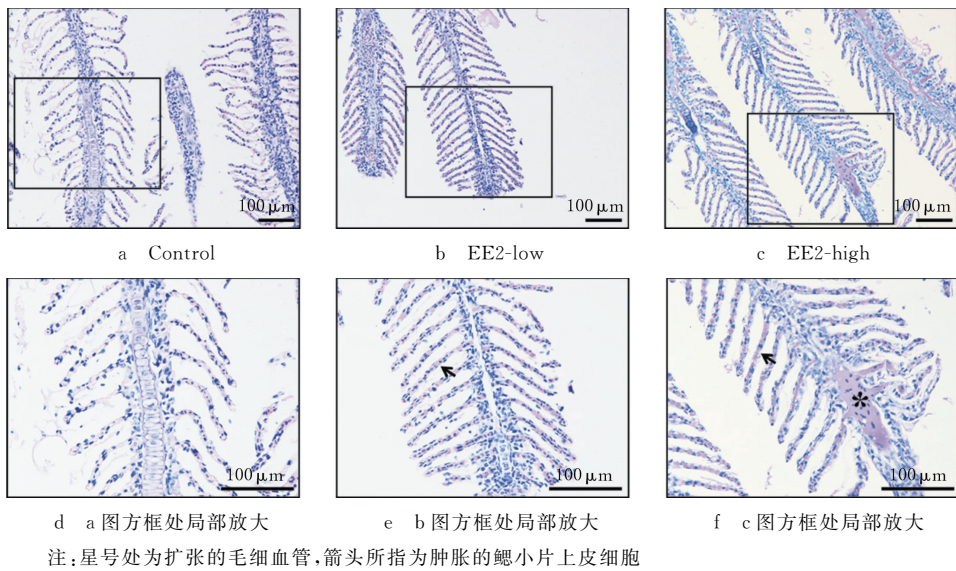


图 3 EE2 暴露对斑马鱼雌性成鱼鳃的影响

Fig. 3 The influence of EE2 exposure on gill of the zebrafish female adults

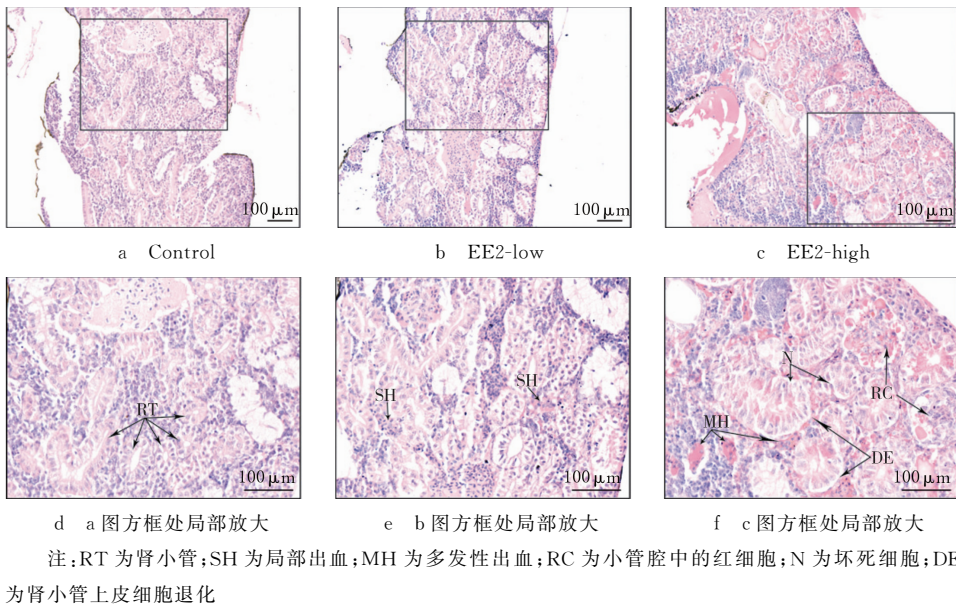


图 4 EE2 处理对斑马鱼雌性成鱼肾脏的影响

Fig. 4 The influence of EE2 exposure on kidney of the zebrafish female adults

3 讨论与结论

以往研究发现,100 ng · L⁻¹的 EE2 暴露对斑马鱼雌性成鱼的形态造成明显的病理学影响,如鳞片竖起、鳃丝充血、肝脏肿胀、颜色变浅等^[6]。与上述研究结果类似,本研究也发现经 EE2-high 处理的斑马鱼雌性的腹部血管扩张,眼球突出,且肥满度上升。有趣的是,与 Control 组相比,EE2-high 组斑马鱼的全血量明显升高。另外,本研究未展示的数据表明,EE2-high 组斑马鱼血细胞总体积无明显变化,但血浆量则明显增大。进一步研究发现,实验鱼的红细胞数量与 EE2 的质量浓度呈明显的负相关关系,这暗示实验鱼体内含水量上升可能是全血量增大的重要原因之一。总之,EE2 短期处理对斑马鱼雌性成鱼的水盐平衡可能造成了严重损害。

包括鱼类在内的所有脊椎动物均须通过肾脏调节体内的渗透压,以维持细胞的水盐平衡,这对细胞正常的功能和活动至关重要^[8]。鱼类生活于水环境中,它们的渗透压调节的方式明显多样化。淡水鱼类的体液为高渗,而生活的水环境为低渗,鱼体易于从外界吸水。因此,淡水硬骨鱼如斑马鱼等具有发达的肾脏和数量众多的肾单位,以排出多余的水分(低渗尿)。其中,肾小球将大量体液滤至肾小管,其间重新吸收掉必须离子如 K⁺, Cl⁻ 等和糖类,然后排出多余的水分^[9]。因此肾小体和肾小管正常功能的维持在鱼类的渗透压调节中起重要作用。本研究结果显示,经 EE2 暴露处理的斑马鱼肾脏中出现管周多发性出血、肾小管上皮细胞肿胀和坏死等现象,表明肾脏受到严重损伤。这将严重影响鱼体对水盐平衡的调节并导致调节失衡。

除肾脏以外,鳃也是鱼类重要的渗透压调节器官^[10]。淡水鱼类中数量较少而海水鱼类中数量众多的氯细胞是鳃进行水和离子转运的重要场所^[11]。氯细胞膜上分布着数量不等的水通道蛋白和离子转运系统,且物种差异极大^[11]。离子转运系统主要分为离子通道和离子转运蛋白,在淡水鱼类中主要参与对离子的摄取^[13-14];而水通道蛋白则负责对水分子的摄入^[12]。因此,鳃丝的完整性和正常结构对维持鱼类的呼吸和渗透压调节均不可或缺^[15]。本研究发现,EE2 暴露处理对斑马鱼雌性成鱼的鳃造成了明显的形态学损伤,如鳃上皮细胞肿胀、排列紊乱、毛细血管扩张等。上述损伤不仅严重影响鱼类的呼吸,还可能直接干扰鱼体的水盐平衡调节。

综上所述,本研究推测,EE2 短期暴露所导致的斑马鱼雌性成鱼主要的渗透压调节器官鳃和肾脏组织结构的病变,可能诱导了斑马鱼渗透压调节失衡,致使斑马鱼全血量、血浆量增加,而红细胞数量则减少。因此,EE2 短期暴露对斑马鱼雌性成鱼具有明显的渗透压毒性,但其中毒理机制有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 杨莹,刘秀红,王洪臣,等. 污水中 17 α -乙炔基雌二醇的去除及其机理研究进展[J]. 水处理技术,2016(5):45-50.
YANG Y,LIU X H,WANG H C,et al. Research progress on the removal and mechanism of 17 α -ethynylestradiol in waste water treatment[J].Technology of Water Treatment, 2016(5):45-50.
- [2] WEBER L P,HILL R L,JANZ D M. Developmental estrogenic exposure in zebrafish (*Danio rerio*):II. Histological evaluation of gametogenesis and organ toxicity[J]. Aquatic Toxicology,2003,63(4):431-446.
- [3] MILLER H D,CLARK B W,HINTON D E,et al. Anchoring ethynylestradiol induced gene expression changes with testicular morphology and reproductive function in the medaka[J]. Plos One,2012,7(12):e52479.
- [4] PORSERYD T,REYHANIAN C N,VOLKOVA K,et al. Testis transcriptome alterations in zebrafish (*Danio rerio*) with reduced fertility due to developmental exposure to 17 α -ethynylestradiol[J]. General and Comparative Endocrinology,2018,262:44-58.
- [5] 郭学鸣,李英文,尹盼等. EE2 抑制斑马鱼卵巢发育和卵母细胞发生[J]. 重庆师范大学学报(自然科学版),2015,32(3):30-34.
- [6] GUO X M,LING Y W,YIN P,et al. The inhibition of 17 α -ethynylestradiol on zebrafish (*Danio rerio*) ovarian development and oogenesis[J]. Journal of Chongqing Normal University (Natural Science),2015,32(3):30-34.
- [7] 饶剑军. EE2 损伤雌性斑马鱼成鱼(*Danio rerio*) 卵巢、肝脏和鳃的毒理机制[D]. 重庆:重庆师范大学,2016.
- [8] RAO J J. Toxicological mechanism of EE2 damage ovary, liver and gill in adult female zebrafish [D]. Chongqing: Chongqing Normal University,2016.
- [9] BABAEI F,RAMALINGAM R,TAVENDALE A,et al. Novel blood collection method allows plasma proteome analysis from single zebrafish[J]. Journal of Proteome Research,2013,12(4):1580-1590.
- [10] DONATO V,LACQUANITI A,CERNARO V,et al. From water to aquatics:a legendary route[J]. Cell Physiology Biochemistry, 2014,33(5):1369-1388.
- [11] 谢志浩. 鱼类的渗透压调节[J]. 生物学通报,2002,37(5):22-23.
- [12] XIE Z H. Osmotic adjustment of fish[J]. Biology Bulletin, 2002,37(5):22-23.

- [10] GUH Y J, LIN C H, HWANG P P. Osmoregulation in zebrafish: ion transport mechanisms and functional regulation[J]. *EXCLI Journal*, 2015, 14: 627-659.
- [11] CRAIG P M, WOOD C M, Mc CLELLAND G B. Gill membrane remodeling with soft-water acclimation in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Physiol Genomics*, 2007, 30(1): 53-60.
- [12] NIELSEN S, FRØKLÆR J, MARPLES D, et al. Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine[J]. *Physiological Reviews*, 2002, 82(1): 205-244.
- [13] SHIGEHISA H, TOYOJY K, NOBUKE N, et al. Molecular biology of major components of chloride cells [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 2003, 36(4): 593-620.
- [14] 尹飞, 孙鹏, 彭士明, 等. 低盐度胁迫对银鲳幼鱼肝脏抗氧化酶, 鳃和肾脏 ATP 酶活力的影响[J]. *应用生态学报*, 2011, 22(4): 1059-1066.
- YIN F, SUN P, PENG S M, et al. Effects of low salinity stress on the antioxidant enzyme activities in juvenile *Pampus argenteus* liver and the APTase activities in its gill and kidney [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2011, 22(4): 1059-1066.
- [15] EVANS D H, PIERMARINI P M, CHOE K P. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste [J]. *Physiological Reviews*, 2005, 85(1): 97-177.

Animal Sciences

Short-Term Exposure of 17 α -ethinylestradiol (EE2) Impaired the Osmo-Regulation of Zebrafish Female Adults

LIU Zhihao, LAN Xuerong, LI Yingwen

(Chongqing Engineering Research Center of Bioactive Substances, Chongqing Key Laboratory of Animal Biology, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract: [Purposes] 17 α -ethinylestradiol (EE2) has been proved to impair oogenesis and ovarian maturation in fish. However, whether EE2 is capable of affecting the osmo-regulation of fish remained unknown. [Methods] Adult zebrafish (*Danio rerio*) females were exposed to two concentrations of EE2 (10 and 100 ng · L⁻¹) and control (without EE2) for 7 days. After exposure, the morphology, condition factor, total blood volume, plasma volume, concentration of red blood cell and the histology of gill and kidney of the fish were measured. [Findings] After exposure, morphological impairments, such as protopsis and trichangiectasis in the skin, as well as increased condition factor, were observed. In addition, elevated blood volume and plasma volume while decreased concentration of red blood cells were further present in exposed fish. Histological changes, such as swelling branchial epithelial cells and trichangiectasis in gill and swelling tubular epithelial cells and hemorrhage in interrenal tissues of kidney were observed. [Conclusions] Short-term exposure of EE2 impaired the osmo-regulation of zebrafish female adults, indicating the strong osmo-toxicity of EE2 on zebrafish females.

Keywords: 17 α -ethinylestradiol; female zebrafish; short-term exposure; osmo-regulation

(责任编辑 方 兴)

饥饿对鲫鱼幼鱼静止代谢及个性行为的影响*

凌 鸿, 曾令清

(重庆师范大学 进化生理与行为学实验室 动物生物学重庆市重点实验室, 重庆 401331)

摘要:【目的】考察饥饿对鲤科鱼类表型性状(能量代谢和个性行为)的影响。【方法】以鲫(*Carassius auratus*)幼鱼为研究对象,在(25±0.5)℃条件下首先测定60尾实验鱼的静止代谢率(Resting metabolic rate, RMR),并从中筛选出30尾实验鱼,测定它们的形态参数和个性行为(勇敢性和好斗性);然后对筛选出的实验鱼饥饿处理14d后再次测定它们的形态参数和个性行为。【结果】饥饿处理明显降低实验鱼的体质量和肥满度,但对RMR和勇敢性均无影响,并使得好斗性评价参数中的撕咬次数降低。鲫鱼RMR和形态参数均具有明显的重复性,但个性行为的重复性整体上较低。饥饿处理前后实验鱼的RMR与个性行为均不相关,但不同的个性行为间存在的表型关联不受饥饿影响。【结论】鲫鱼RMR和形态特征在饥饿后仍维持较高的重复性,饥饿并未增强个体的勇敢性和好斗性。

关键词:静止代谢率;个性行为;表型;适合度;鲫

中图分类号:Q175

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2019)05-0052-08

动物的行为特征具有稳定个体差异现象,被称作“动物个性”(Animal personality)^[1-2]。有关种内的个体差异很少在个体间形态上进行比较,因为同一物种的不同个体在外观形态上十分相似。因此研究人员主要从种内个体的生理功能和行为特征进行个体差异分析。最近,有关鱼类种内个体差异的研究已逐渐成为鱼类生态学的研究热点,并且多以鱼类静止代谢率(Resting metabolic rate, RMR)的个体差异作为研究起点^[2-3]。这是因为RMR是动物生活史重要的能量代谢参数之一,它影响机体生长、运动、繁殖等生理功能的能量分配^[4-5]。因此,不同生理功能与行为之间的能量分配权衡可能导致动物种内个体的生活史对策和适合度在时空上存在差异,相关研究具有重要的理论意义和研究价值。

饥饿是鱼类在自然水域生态系统中所必须面对的一种环境胁迫,与自然界中食物分布在空间上的不均匀性、季节更替或环境剧变等原因有关^[6-7]。即使在人工养殖条件下,养殖密度过大、个体间相互竞争、投饵不足、投喂技术不当等都可能引起鱼类面临因食物短缺而引起的饥饿胁迫^[8]。研究表明,饥饿可以降低鱼类代谢^[9],改变游泳行为^[10],影响组织结构、存活、繁殖、酶活性等^[11-12]。在饥饿状态下,鱼类的代谢机能发生改变以适应不同营养状况,通过利用鱼体自身的储存物质提供能量来维持生命活动。虽然有关饥饿对鱼类RMR影响的报道十分丰富,但有关饥饿对个性行为的研究迄今为止相对较少。

鲫(*Carassius auratus*)是广泛分布在温带地区淡水水域的底栖杂食性鱼类,生性活泼好动,适应性强^[13],已有研究者从代谢模式^[14]、偏好游泳能力^[15]、耗氧率^[16]、血液生化指标^[17]等方面对鲫幼鱼进行了研究。由于鲫幼鱼能够较长时间地耐受饥饿^[16],故本研究以鲫幼鱼为实验对象,研究饥饿对它的RMR及个性行为的影响,测定鲫幼鱼在有无饥饿胁迫下的代谢(RMR)和个性行为(勇敢性和好斗性)以及两者之间的关系,并比较两种条件下测得的勇敢性与好斗性指标,为评价鲫幼鱼在不同的生长环境中的行为及代谢提供基础资料,并揭示鲫幼鱼个体的生活史对策及适合度的时空差异。

1 材料与方法

1.1 实验鱼的来源及驯养

用于实验的鲫幼鱼购自重庆市北碚区歇马镇养殖基地。使用被动集成应答器(Passive integrated transpon-

* 收稿日期:2019-02-20 修回日期:2019-08-05 网络出版时间:2019-09-26 11:24

资助项目:国家自然科学基金(No. 31300341);重庆市自然科学基金(No. cstc2017jcyjA0029);重庆市高等学校青年骨干教师资助计划项目(No. CQJW-02060301-1714)

第一作者简介:凌鸿,女,研究方向为鱼类比较生理学, E-mail: 15196718074@163.com; 通信作者:曾令清,男,副教授,博士, E-mail: lingqingzeng@hotmail.com

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20190926.1124.022.html>

der, PIT)对实验鱼进行体内标记,然后在重庆师范大学进化生理与行为学实验室的自净化循环控温水槽(20 L)中驯养 30 d,驯养的水温为(25±0.5)℃从而保持与鲫鱼养殖水温一致。驯养期间以中国通威公司生产的商业饲料每天定量投喂 3 次,投喂时间分别为每日的 9:00, 15:00 和 19:00。投喂 0.5 h 后用虹吸法清除残饵和粪便,日换水量约为驯化水体体积的 10%;实验用水为曝气控温后的自来水,用充气泵不断向水中充气,使水中溶氧水平接近于饱和(大于 7 mg·L⁻¹)。光周期为光照 14 h:10 h 黑暗。

1.2 实验设计

驯养结束后,首先测定 60 尾驯化鱼的形态参数和 RMR,并从中挑选体质量为(9.04±0.15)g、个体健康、大小相近的 30 尾实验鱼,随后测定实验鱼的个性行为(勇敢性和好斗性)。之后,将挑选出来的 30 尾实验鱼单尾移入已编号的单个养殖单元格进行 14 d 饥饿处理,并在饥饿处理后再次测定它们的形态参数、RMR、勇敢性和好斗性。

1.3 形态参数的测定

测定每尾实验鱼形态参数时,体质量的测量精度为 0.01 g,体长的测量精度为 0.1 cm。鲫幼鱼个体肥满度用 Fulton 状态指数判定^[18-19],计算公式为:

$$K = \frac{100 \times m}{l^3} \quad (1)$$

式中:K 为肥满度(单位:g·cm⁻³),m 为体质量(单位:g),l 为体长(单位:cm),100 为人为规定的固定系数。

1.4 RMR 的测定

RMR 的测定选用流水式呼吸代谢仪进行测定,用耗氧率来表征。测定时提前 24 h 将单尾实验鱼装入呼吸室适应环境,适应完毕后分别在第 2 日的 9:00, 11:00, 13:00, 15:00, 17:00, 19:00 和 21:00 用溶氧仪(HQ_{30d}, 美国哈希公司)测定实验鱼的耗氧率,将上述时刻测定的耗氧率取平均值作为 RMR。计算 RMR 的公式为:

$$V_{\text{RMR}} = \Delta w_{\text{O}_2} \times v \quad (2)$$

式中: V_{RMR} 为 RMR(单位:mg·h⁻¹); Δw_{O_2} 是实验呼吸室出口处与空白对照的溶氧质量浓度差值(单位:mg·L⁻¹); v 是实验呼吸室出水口的流量(单位:L·h⁻¹),由呼吸室出水口每流出 50 mL 水所需要的时间计算获得。

由于实验鱼个体间的体质量仍存在差异,并且体质量影响了 RMR 的比较,所以须对所有实验鱼进行体质量校正。校正方法为:首先对单尾鱼的体质量和 RMR 求以 10 为底的对数,然后对新的体质量和 RMR 数据进行线性回归以获取单尾鱼 RMR 的残差和回归方程;再利用以下方程将所有鱼的 RMR 校正至标准体质量(本研究为 9.04 g)^[20]:

$$\log_{10} V_{\text{RMR}} = \log_{10} b + a \log_{10} m + \epsilon \quad (3)$$

式中:m 和 V_{RMR} 的含义见(1),(2)式;小写字母 a, b 为常数,ε 为 RMR 的残差。

1.5 个性行为的测定

1.5.1 勇敢性 勇敢性用于评价实验鱼在不确定环境(如有捕食者或其他胁迫因素)中的风险承担能力,常用模拟捕食者存在下的鱼类行为反应如潜伏时间、潜伏比例、接近食物距离等进行评价^[21]。本研究采用白鹭模型模拟捕食者,该模型个体形态、大小、颜色模拟成年白鹭。将实验鱼放入行为观察水箱驯化 1 h,观察水箱的结构见前期文献^[21]。驯化结束后,当鱼在距离食物环 1 倍体长区域内或准备进行摄食时,使用白鹭模型进行模拟捕食者攻击实验鱼,快速地将白鹭模型的喙侵入水中 3 cm 后快速上升,实验鱼因受到惊吓快速游进行为观察水箱的准备区。待水面平静后,打开在实验区正上方的摄像机连续录像 20 min。选择白鹭模型作为捕食者的原因在于:白鹭是鲫等鱼类常见的水面捕食者,二者之间具有天然的捕食者-猎物关系^[22]。每尾鱼的勇敢性行为重复测定 2 次,共获 3 个视频。对视频进行分析,计算实验鱼的潜伏时间(袭击后至游出准备区)和实验区的暴露时间及穿梭次数。如果实验鱼的潜伏时间越短、在实验区的暴露时间越长及穿梭次数多,该鱼的勇敢性越高。

1.5.2 好斗性 好斗性以入侵者方式评价,实验鱼的大小与入侵个体相当。在勇敢性测定完毕后,将实验鱼转移至好斗性行为实验装置的竞技场^[21]适应 2 h,竞技场的大小为长 35 cm×25 cm,实验鱼可以在其中自由活动,以提高鱼对实验水箱环境熟悉感。将入侵者固定于两端用网状丝绢固定好的透明呼吸室中驯化 2 h,随后将装有入侵鱼的呼吸室在水体中转移至竞技场内,随后连续摄像 10 min,观察实验鱼对入侵鱼的行为反应。作为入侵者的鲫幼鱼共 5 尾,即重复摄像 4 次,而实验鱼个体保持不变。对视频进行分析,获取好斗性评价参数^[23]如下:

1) 警告行为:当实验鱼开始出现头朝向呼吸室中入侵者、并且游向入侵者时,这一行为的出现表明实验鱼开始攻击入侵者,该行为可能在拍摄视频的所有时间段出现,因此需要计算所有行为的次数。2) 追随时间:在警告之后,实验鱼随着入侵者的移动而发生质心移动,计算次数。3) 撕咬频率:实验鱼表现用力撞击呼吸室外壁而摆尾频率较快,计算撕咬次数。实验个体对入侵个体的警告、追随和撕咬(冲击呼吸室)的次数越多,该实验鱼的好斗性越强。

1.6 数据处理与统计

用 Excel 2007 软件对所有实验数据做常规计算,所有实验数据均用“平均值±标准误”表示。用 SPSS 19.0 统计软件中的配对 t -检验对实验鱼在饥饿处理前后的 RMR、表型参数的平均值差异进行统计学检验,而 RMR、行为参数及形态参数的重复性则采用该软件的 Pearson 相关分析进行考察。当 $p < 0.05$ 时,上述统计分析结果具有统计学意义。

2 结果

2.1 RMR

实验鱼的 RMR、形态参数及个性行为的变化如表 1 所示。与饥饿处理前相比,饥饿处理后的实验鱼形态参数有统计学意义上的降低 ($p < 0.001$);而饥饿处理前后的实验鱼 RMR、勇敢性及好斗性均无统计学意义上的差异。同时,图 1 显示在饥饿处理前后,实验鱼的 RMR 和体质量、体长、肥满度等形态参数的重复性均较好 ($p < 0.05$)。

2.2 勇敢性

饥饿处理前后实验鱼勇敢性参数对比如图 2 所示。其中,实验鱼的暴露时间在饥饿处理前后无统计学意义上的相关性;鲫幼鱼的潜伏时间、穿梭次数在饥饿处理前后均呈统计学意义上的相关性 ($p < 0.05$)。

2.3 好斗性

图 3 为饥饿处理前后鲫幼鱼的好斗性参数对比。从该图可知,实验鱼的警告次数、追随次数和撕咬次数在饥饿处理前后均无统计学意义上的相关性,即重复性差。

表 1 饥饿处理前后鲫幼鱼形态参数、RMR 和个性行为的变化

Tab. 1 The phenotypic, metabolism, and personality parameters of juvenile *C. auratus* subjected to starvation at the beginning and the end of the experiment

参数	饥饿处理前	饥饿处理后	t	p
形态				
体质量/g	10.87±0.17 ^a	9.55±0.16 ^b	10.959	<0.001
体长/cm	7.19±0.04 ^a	7.11±0.03 ^b	2.284	0.030
肥满度/(g·cm ⁻³)	2.92±0.03 ^a	2.65±0.04 ^b	7.404	<0.001
代谢				
RMR/(mg·h ⁻¹)	1.64±0.11 ^a	1.47±0.11 ^a	1.423	0.166
勇敢性				
潜伏时间/s	471.0±53.8 ^a	485.7±52.8 ^a	0.348	0.731
暴露时间/s	261.6±46.9 ^a	263.8±34.8 ^a	0.039	0.969
穿梭次数	13.8±7.9 ^a	17.2±7.0 ^a	0.646	0.523
好斗性				
警告次数	6.2±0.5 ^a	6.7±0.6 ^a	0.756	0.456
追随次数	3.9±0.4 ^a	3.3±0.6 ^a	1.001	0.325
撕咬次数	10.5±1.6 ^a	3.0±0.8 ^b	5.989	<0.001

注:上标不同小写字母表示同一行数据有统计学意义上的差异 ($p < 0.05$)。

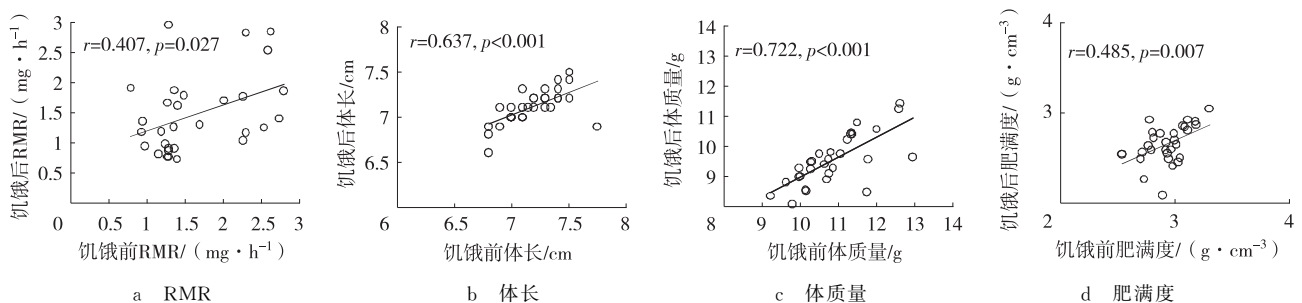


图 1 饥饿处理前后鲫幼鱼 RMR 和形态参数的重复性

Fig. 1 The repeatability of RMR and morphological parameters in juvenile *C. auratus* at the beginning and the end of the experiment

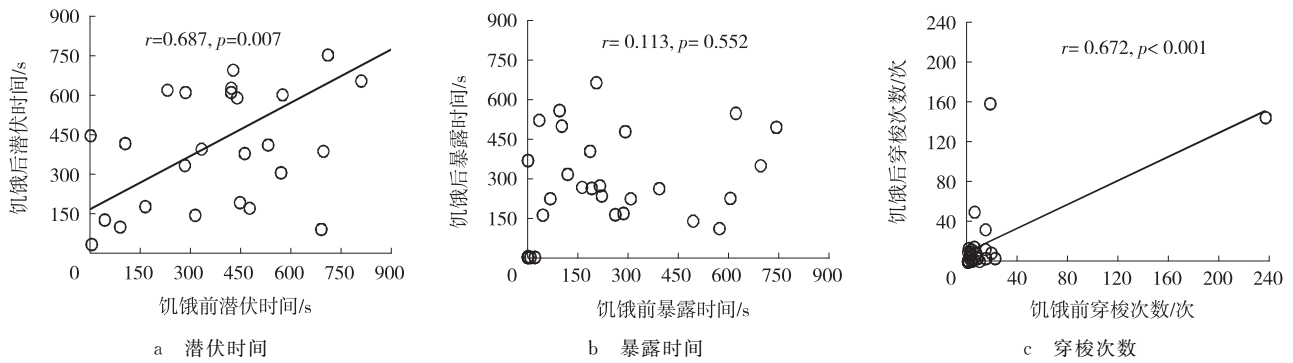


图 2 饥饿处理前后鲫幼鱼勇敢性的重复性

Fig. 2 The repeatability of boldness in juvenile *C. auratus* at the beginning and at the end of the experiment

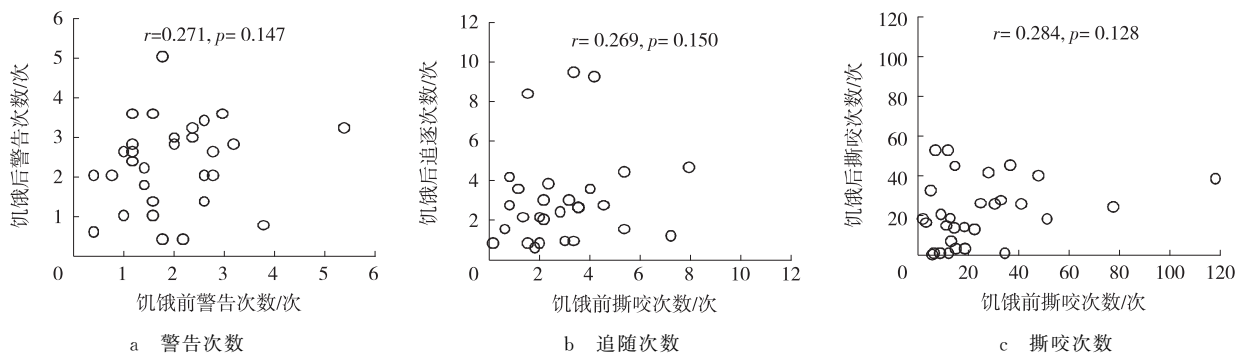


图 3 饥饿处理前后鲫幼鱼好斗性的重复性

Fig. 3 The repeatability of aggression in juvenile *C. auratus* at the beginning and at the end of the experiment

2.4 勇敢性和好斗性之间的关联

实验鱼的勇敢性与好斗性行为之间的关系如表 2 所示,饥饿处理前,勇敢性行为中的潜伏时间与暴露时间和穿梭次数呈统计学意义上的负相关关系($p < 0.05$);好斗性行为中的警告次数与追随次数和撕咬次数呈统计学意义上的正相关关系($p < 0.01$);追随次数与撕咬次数呈统计学意义上的正相关关系($p < 0.01$)。经过 14 d 的饥饿处理,实验鱼上述勇敢性和好斗性行为间存在的正(负)相关关系仍然具有统计学意义($p < 0.01$)。

2.5 RMR 与个性行为的关联

实验鱼在饥饿处理前后的 RMR 与个性行为的关系如表 3 所示,从中可见:无论有无饥饿处理,实验鱼的 RMR 与个性行为之间均没有统计学意义上的相关性。

3 讨论

饥饿作为自然界常见的环境胁迫因子,不仅导致动物的个体质量、饱满度等降低,也引起生理功能的下调、能量代谢水平的降低^[24-25]以及运动能力的改变。鱼类在饥饿过程中,可以通过调节代谢水平、能量分配、行为运动以及自身物质的储存与利用来适应这种环境胁迫^[25-26]。在 20 °C 条件下,14~28 d 饥饿处理对鲫幼鱼的耗氧率无明显影响^[27]。在 15 和 25 °C 条件下,鲤(*Cyprinus carpio*)幼鱼在饥饿 14 d 后的 RMR 无明显变化^[28]。在 25 °C 条件下,鲇(*Silurus asotus*)幼鱼采用阶段性 RMR 降低的方式来适应饥饿环境^[29]。在 25 °C 条件下,中华倒刺鲃(*Spinibarbus sinensis*)幼鱼的 RMR 在饥饿处理 7 d 后明显下降;而在 15 °C 条件下,该种鱼的 RMR 在饥饿处理 28 d 后才明显下降^[30-31]。上述研究表明,不同鱼类应对饥饿胁迫的代谢调整策略不尽相同,并且受到水温的交互影响。本研究发现,饥饿处理 14 d 对鲫幼鱼的 RMR 并无明显影响,这与前期研究结果一致^[27-28]。在面对饥饿胁迫时,鱼类是否下调 RMR 可能与生态习性(如运动类型)有关。中华倒刺鲃为运动型,而鲇属于伏击型,鲤和鲫介于二者之间。短期饥饿胁迫可能使伏击型鱼类的 RMR 出现明显下降,但对运动型鱼类的 RMR 影响相对较小。

与其他形态学或生活史特征一样,个性行为如勇敢性和侵略性也受遗传基因和环境因素的影响^[32]。本研究

利用白鹭的模型模拟捕食者,以此来测定鲫幼鱼的勇敢性。然而与预期结果相反,饥饿胁迫并未提高鲫幼鱼的勇敢性,可能是由于实验鱼 RMR 的变动影响个体食欲调整强度,而实验鱼 RMR 相对稳定^[33],故食欲在短期饥饿期间能维持稳定。对于鲫幼鱼的好斗性行为而言,虽然饥饿胁迫对鲫幼鱼警告次数和追随次数并未产生明显的影响,但明显降低了该种鱼的撕咬频率,表明饥饿胁迫降低了实验鱼对同种入侵者的攻击倾向。

表 2 鲫幼鱼在饥饿前后勇敢性和好斗性的关系

Tab. 2 The behavioural correlations between boldness and aggression in juvenile *C. auratus* at the beginning and the end of the experiment

处理	参数	暴露时间	穿梭次数	警告次数	追随次数	撕咬次数
	潜伏时间	$r = -0.825^{**}$, $p < 0.001$	$r = -0.379^*$, $p = 0.039$	$r = -0.013$, $p = 0.945$	$r = -0.203$, $p = 0.282$	$r = -0.035$, $p = 0.855$
	暴露时间		$r = 0.320$, $p = 0.085$	$r = -0.044$, $p = 0.817$	$r = 0.144$, $p = 0.449$	$r = 0.020$, $p = 0.916$
饥饿处理前	穿梭次数			$r = -0.040$, $p = 0.834$	$r = -0.163$, $p = 0.390$	$r = -0.090$, $p = 0.636$
	警告次数				$r = 0.628^{**}$, $p < 0.001$	$r = 0.561^{**}$, $p = 0.001$
	追随次数					$r = 0.824^{**}$, $p < 0.001$
	潜伏时间	$r = -0.636^{**}$, $p < 0.001$	$r = -0.494^{**}$, $p = 0.005$	$r = 0.176$, $p = 0.353$	$r = -0.111$, $p = 0.561$	$r = -0.141$, $p = 0.449$
	暴露时间		$r = 0.237$, $p = 0.207$	$r = -0.359$, $p = 0.051$	$r = -0.152$, $p = 0.423$	$r = -0.104$, $p = 0.583$
饥饿处理后	穿梭次数			$r = -0.154$, $p = 0.417$	$r = 0.275$, $p = 0.141$	$r = 0.351$, $p = 0.057$
	警告次数				$r = 0.480^{**}$, $p = 0.007$	$r = 0.585^{**}$, $p = 0.001$
	追随次数					$r = 0.742^{**}$, $p < 0.001$

注:*,**分别表示统计结果在 $p < 0.05$ 和 $p < 0.01$ 水平上具有统计学意义。

表 3 鲫幼鱼实验前后代谢与个性行为的关系

Tab. 3 The correlations between RMR and personality in juvenile *C. auratus* at the beginning and end of experiment

个性行为参数	饥饿处理前 RMR	饥饿处理后 RMR	个性行为参数	饥饿处理前 RMR	饥饿处理后 RMR
潜伏时间	$r = -0.277, p = 0.139$	$r = -0.095, p = 0.618$	警告次数	$r = -0.084, p = 0.660$	$r = 0.308, p = 0.098$
暴露时间	$r = 0.230, p = 0.221$	$r = 0.094, p = 0.620$	追随次数	$r = -0.274, p = 0.143$	$r = -0.071, p = 0.709$
穿梭次数	$r = 0.360, p = 0.051$	$r = 0.321, p = 0.084$	撕咬次数	$r = -0.114, p = 0.548$	$r = 0.042, p = 0.826$

个性行为的相关性很少得到清晰阐述,因为在自然环境中,鱼类行为具有可塑性,而这种可塑性有利于鱼类的生存^[34]。一些研究表明,好斗性越强的个体也更加大胆^[35-36];然而这种相关性并非普遍存在,如本研究中,鲫幼鱼的勇敢性与好斗性行为均不相关。而三刺鱼(*Gasterosteus aculeatus*)在有捕食者存在时它的好斗性与勇敢性才有明显的相关关系^[37]。本研究中,14 d 的饥饿处理并未改变实验鱼潜伏时间与暴露次数和穿梭次数的相关性,同样也未改变实验鱼的警告次数与追随次数和撕咬次数的相关性;而且这一处理并未使得鲫幼鱼的勇敢性和好斗性行为具有相关性。这一结果说明短期的饥饿胁迫对鲫幼鱼个性行为的影响较低。

稳定个体变异(Consistent individual differences)是指动物表型如生理、行为、形态等存在种内个体变异并且

这种变异在一段时期内保持相对稳定,可重复测量。该方面的相关研究具有重要的生态和进化意义^[2]。有学者认为,个性行为和 RMR 在一段时间内保持稳定,可能是经历^[38]和遗传有关^[39]。虽然一些研究认为动物表型特征的重复性随时间延长而降低,且实验室测定的表型重复性明显高于野外测定^[40],但在饥饿胁迫下,本研究中鲫幼鱼 RMR 和形态参数重复性均较高。另外,本研究中鲫幼鱼的勇敢性行为表现出一定的重复性,而好斗性行为则无明显的重复性,这表明饥饿胁迫下的鲫幼鱼勇敢性有稳定的个体变异,而好斗性变异较大。

综上所述,本研究中的饥饿胁迫明显影响了鲫幼鱼的形态学特征,但对 RMR 无明显影响,可能是饥饿时间较短或者鲫鱼的生态习性的原因;饥饿处理对鲫幼鱼的勇敢性无明显影响,对好斗性也基本无影响,表明短期饥饿胁迫不会使鲫鱼的个性行为发生较大改变;鲫幼鱼在饥饿情况下,它的代谢、形态、勇敢性及个性行为间的关联具有稳定的个体变异。

参考文献:

- [1] CAREAU V, GARLAND T. Performance, personality, and energetics: correlation, causation, and mechanism[J]. *Physiological and Biochemical Zoology*, 2012, 85(6): 543-571.
- [2] BIRO P A, STAMPS J A. Do consistent individual differences in metabolic rate promote consistent individual differences in behavior? [J]. *Trends in Ecology and Evolution*, 2010, 25(11): 653-659.
- [3] BURTON T, KILLEN S S, ARMSTRONG J D, et al. What causes intraspecific variation in resting metabolic rate and what are its ecological consequences? [J]. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2011, 278(1724): 3465-3473.
- [4] FU S J, XIE X J. Nutritional homeostasis in carnivorous southern catfish (*Silurus meridionalis*): is there a mechanism for increased energy expenditure during carbohydrate overfeeding? [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A Molecular and Integrative Physiology*, 2004, 139(3): 359-363.
- [5] FU S J, XIE X J, CAO Z D. Effect of fasting and repeat feeding on metabolic rate in southern catfish, *Silurus meridionalis* Chen [J]. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 2005, 38(3): 191-198.
- [6] FISHELSON L. Experiments and observations on food consumption, growth and starvation in *Dendrochirus brachypterus* and *Pterois volitans* (*Pteroinae, Scorpaenidae*) [J]. *Environmental Biology of Fishes*, 1997, 50(4): 391-403.
- [7] MEHNER T, WIESER W. Energetics and metabolic correlates of starvation in juvenile perch (*Perca fluviatilis*) [J]. *Journal of Fish Biology*, 2010, 45(2): 325-333.
- [8] KIM M K, LOVELL R T. Effect of restricted feeding regimens on compensatory weight gain and body tissue changes in channel catfish *Ictalurus punctatus* in ponds [J]. *Aquaculture*, 1995, 135(4): 285-293.
- [9] 曾令清, 彭韩柳依, 王健伟, 等. 南方鲂幼鱼运动代谢的个体变异和重复性及其饥饿响应 [J]. *水产学报*, 2015, 39(1): 52-64.
- ZENG L Q, PENG-HAN L Y, WANG J W, et al. Repeatability and variation in locomotion metabolism of the juvenile southern catfish during starvation [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(1): 52-64.
- [10] WERNER E E, ANHOLT B R. Ecological consequences of the trade-off between growth and mortality-rates mediated by foraging activity [J]. *American Naturalist*, 1993, 142: 242-272.
- [11] AMALIA PÉREZ-JIMÉNEZ, GUEDES M J, MORALES A E, et al. Metabolic responses to short starvation and refeeding in *Dicentrarchus labrax*. effect of dietary composition [J]. *Aquaculture*, 2007, 265(1/2/3/4): 325-335.
- [12] 张永泉, 刘奕, 徐伟, 等. 饥饿对哲罗鱼仔鱼形态、行为和消化器官结构的影响 [J]. *大连海洋大学学报*, 2010, 25(4): 330-336.
- ZHANG Y Q, LIU Y, XU W, et al. The effects of starvation on morphology, behavior and digestive system in larval Taimen Hucho taimen [J]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2010, 25(4): 330-336.
- [13] 丁瑞华. 四川鱼类志 [M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1994.
- DING R H. *The Fishes of Sichuan* [M]. Chengdu: Sichuan Science and Technology, 1994.
- [14] 张伟, 曹振东, 付世建. 溶氧水平对鲫鱼代谢模式的影响 [J]. *生态学报*, 2012, 32(18): 5806-5812.
- ZHANG W, CAO Z D, FU S J. Effect of dissolved oxygen level on metabolic mode in juvenile crucian carp [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2012, 32(18): 5806-5812.
- [15] 吴青怡, 曾令清, 付世建. 不同营养状况对鲫鱼偏好游泳速度的影响 [J]. *中国水产科学*, 2016, 23(3): 565-573.
- WU Q Y, ZENG L Q, FU S J. Preferred swimming behavior in the crucian carp (*Carassius auratus*) at different nutrition status [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(3): 565-573.
- [16] ZENG L Q, FU C, FU S J. The effects of temperature and food availability on growth, flexibility in metabolic rates and their relationships in juvenile common carp [J]. *Com-*

- parative Biochemistry and Physiology, Part A, Molecular & Integrative Physiology, 2018, 217: 26-34.
- [17] 程超, 施光美. 饥饿对鲫鱼血液生理生化指标和流变学性质的影响[J]. 中国农学通报, 2008, 24(1): 516-519.
CHENG C, SHI G M. Effects of starvation on blood physio-biochemical indices and hemorheological properties of *Carassius auratus*[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2008, 24(1): 516-519.
- [18] 戴强, 戴建洪, 李成, 等. 关于肥满度指数的讨论[J]. 应用与环境生物学报, 2006, 12(5): 715-718.
DAI Q, DAI J H, LI C, et al. Discussion on relative fatness [J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2006, 12(5): 715-718.
- [19] 王刚, 李成, 吴军, 等. 基于人工掩蔽物法的若尔盖湿地中华蟾蜍种群生态研究[J]. 生态学报, 2016, 36(17): 5556-5563.
WANG G, LI C, WU J, et al. Population ecology of *Bufo gargarizans* in Zoige wetland based on artificial cover[J]. Acta Ecologica Sinica, 2016, 36(17): 5556-5563.
- [20] 凌鸿, 冯琪, 陈月琴, 等. 成对鲫鱼游泳行为与标准代谢率的关系[J]. 重庆师范大学学报(自然科学版), 2018(5): 41-77.
LING H, FENG Q, CHEN Y Q, et al. Correlations between Standard Metabolic Rate and Swimming Behavior in Paired Juvenile *Carassius auratus*[J]. Journal of Chongqing Normal University (Natural Science), 2018(5): 41-77.
- [22] FU C, FU S J, CAO Z D, et al. Habitat-specific anti-predator behavior variation among pale chub (*Zacco platypus*) along a river[J]. Marine and Freshwater Behaviour and Physiology, 2015, 48(4): 1-12.
- [22] 辜永河. 白鹭的栖息地与取食行为的研究[J]. 动物学杂志, 1996, 3(1): 23-24.
GU Y H. Study on habitat and feeding behavior of egret [J]. Chinese Journal of Zoology, 1996, 3(1): 23-24.
- [23] EERMAN A P, WIESKI K, BAIRD D J. Behavioural versus physiological mediation of life history under predation risk[J]. Oecologia, 2007, 152(2): 335-343.
- [24] MCCUE M D. Starvation physiology: reviewing the different strategies animals use to survive a common challenge [J]. Comparative Biochemistry and Physiology A, 2010, 156(1): 1-18.
- [25] O'CONNOR KI, TAYLOR A C, METCALFE N B. The stability of standard metabolic rate during a period of food deprivation in juvenile Atlantic salmon[J]. Journal of Fish Biology, 2000, 57(1): 41-51.
- [26] COOK J T, SUTTERLIN A M, MCNIVEN M A. Effect of food deprivation on oxygen consumption/body composition of growth-enhanced transgenic Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. Aquaculture, 2000, 188(1): 47-63.
- [27] 彭韩柳依, 曹振东, 付世建. 饥饿对鲫鱼幼鱼游泳能力的影响[J]. 生态学杂志, 2014, 33(10): 2756-2760.
PENG-HAN L Y, CAO Z D, FU S J. Effect of starvation on swimming performance of juvenile crucian carp [J]. Chinese Journal of Ecology, 2014, 33(10): 2756-2760.
- [28] 付成, 曹振东, 付世建. 温度和饥饿对鲤鱼幼鱼静止代谢率及自发运动的影响[J]. 动物学杂志, 2012, 47(2): 85-90.
FU C, CAO Z D, FU S J. The Influence of temperature and starvation on resting metabolic rate and spontaneous activity in juvenile *Cyprinus carpio* [J]. Chinese Journal of Zoology, 2012, 47(2): 85-90.
- [29] 汤洪芬, 曹振东, 付世建. 饥饿对鲢鱼幼鱼静止代谢率的影响[J]. 重庆师范大学学报(自然科学版), 2007, 24(1): 72-75.
TANG H F, CAO Z D, FU S J. The influence of starvation on metabolism of the juvenile Chinese catfish (*Silurus asotus* Linnaeus) [J]. Journal of Chongqing Normal University (Natural Science), 2007, 24(1): 72-75.
- [30] 唐金玉, 曾令清, 彭姜岚, 等. 饥饿对中华倒刺鲃幼鱼最大代谢和运动能力的影响[J]. 重庆师范大学学报(自然科学版), 2018, 161(3): 69-73.
TANG J Y, ZENG L Q, PENG J L, et al. The effects of fasting on the maximum metabolism and locomotion performance in *Spinibarbus sinensis* [J]. Journal of Chongqing Normal University (Natural Science), 2018, 161(3): 69-73.
- [31] 庞旭, 付世建, 曹振东, 等. 饥饿和温度驯化对中华倒刺鲃静止代谢和游泳能力的影响[J]. 生态学报, 2016, 36(7): 1854-1860.
PANG X, FU S J, CAO Z D, et al. The effects of fasting and acclimation temperature on the resting metabolism and swimming performance in qingbo (*Spinibarbus sinensis*) [J]. Acta Ecologica Sinica, 2016, 36(7): 1854-1860.
- [32] ALISON M, BELL A S. Exposure to predation generates personality in threespined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*) [J]. Ecology Letters, 2007, 10: 828-834.
- [33] KILLEN S S, FU C, WU Q, et al. The relationship between metabolic rate and sociability is altered by food-deprivation [J]. Functional Ecology, 2016, 30(8): 1358-1365.
- [34] SIH A, BELL A, JOHNSON J C. Behavioral syndromes: an ecological and evolutionary overview [J]. Trends in Ecology & Evolution, 2004, 19(7): 327-378.
- [35] JOHNSON J C, SIH A. Precopulatory sexual cannibalism in fishing spiders (*Dolomedes triton*): a role for behavioral syndromes [J]. Behavioral Ecology and Sociobiology, 2005, 58(4): 390-396.

- [36] BELL A M. Behavioural differences between individuals and two populations of stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) [J]. *Journal of Evolutionary Biology*, 2005, 18(2): 464-473.
- [37] BELL A M, SIH A. Exposure to predation generates personality in threespined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*) [J]. *Ecology Letters*, 2010, 10(9): 828-834.
- [38] DINGEMANSE N J, PLAS F V D, WRIGHT J, et al. Individual experience and evolutionary history of predation affect expression of heritable variation in fish personality and morphology [J]. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2009, 276(1660): 1285-1293.
- [39] WONE B, SEARS M W, LABOCHA M K, et al. Genetic variances and covariances of aerobic metabolic rates in laboratory mice [J]. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2009, 276(1673): 3695-3704.
- [40] AUER S K, BASSAR R D, SALIN K, et al. Repeatability of metabolic rate is lower for animals living under field versus laboratory conditions [J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2016, 219(5): 631-63.

Animal Sciences

Effects of Starvation on Resting Metabolic Rate and Personality Behavior of Juvenile *Carassius auratus*

LING Hong, ZENG Lingqing

(Laboratory of Evolutionary Physiology and Behavior, Key Laboratory of Animal Biology of Chongqing, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract: [Purposes] The aim is to investigate the effects of starvation on phenotypic traits (energy metabolism and personality behavior) of the juvenile *Carassius auratus*. [Methods] In order to address this goal, a wide artificial feeding omnivorous juvenile *C. auratus* was used as the experimental object and resting metabolic rate for (RMR) of 60 individuals was measured at $(25.0 \pm 0.5) ^\circ\text{C}$. 30 individuals out of this 60 individuals were selected as the experimental fish. Their morphological parameters and personality behaviors were measured (Boldness and Aggressive, Test I), and after two weeks of starvation, their RMR, morphological parameters, and personality behaviors were measured again (Test II). [Findings] The results showed that: the body weight and condition factor of experimental fishes were significantly reduced after starvation, but no effects on RMR boldness and aggressive were detected except bite times. The RMR and morphological parameters of juvenile *C. auratus* had repeatabilities, but the repeatability of individual behavior is lower as a whole. Whatever in the test I or test II, there were no relationships between RMR and personality behavior. However, the relationships among different personality behaviors parameters were not affected by starvation. [Conclusions] It suggested that the RMR and morphological characteristics of juvenile *C. auratus* are still relatively repetitive in the starvation environment, and the starvation stress does not increase the boldness and aggressive.

Keywords: resting metabolic rate; personality behavior; phenotypic; fitness; *Carassius auratus*

(责任编辑 方 兴)

颜色标记对鲫标准代谢率的影响*

李若琳, 唐晴晴, 王 萌, 杨维佳, 曾令清

(重庆师范大学 进化生理与行为学实验室 重庆市动物生物学重点实验室, 重庆 401331)

摘要:【目的】考察体外颜色标记对鲤科鱼类标准代谢率(Standard metabolic rate, SMR)的影响。【方法】在(25.0±0.5)℃条件下选取40尾体质量大小相近的鲫(*Carassius auratus*)幼鱼作为实验鱼,设定颜色标记前、颜色标记后和摄食生长实验后共计3次SMR和形态参数测定(第0,1和23d)以及21d(第2~22d)的生长实验。摄食期间,于每日9:00和15:00分别对鱼进行饱足投喂并记录单尾鱼的摄食量。【结果】1)颜色标记前后SMR无明显变化,在生长实验期间,形态参数和SMR均有统计学意义上的增加($p<0.05$)。2)实验期间,实验鱼的体质量、体长、饱满度、原始SMR均保持较高的重复性。3)特定生长率(SGR)与摄食率(FI)和饵料效率(FE)存在统计学意义上的正相关关系($p<0.05$),但FI与FE无统计学意义上的相关关系。4)生长实验期间实验鱼的SGR与SMR变化量无统计学意义上的相关关系。【结论】颜色标记对鲫幼鱼的SMR无明显影响,具有运用于科学研究的可行性;鲫的表型参数具有较高的重复性。

关键词:颜色标记;标准代谢率;摄食率;特定生长率;饵料效率;鲫

中图分类号:Q175

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2019)05-0060-06

近些年来,对鱼类种内个体差异的研究多以标准代谢率(Standard metabolic rate, SMR)为研究起点,并受到研究人员的广泛关注^[1]。在研究过程中局部控制的完善有助于考察某一特定环境因素对实验鱼形态、生理、行为等方面的影响。然而,由于同一物种个体的外部形态极为相似,研究人员无法通过肉眼辨别不同个体。颜色标记法可使研究人员在游泳能力、个性行为等方面问题中考察群体水平时,对群体中不同个体进行不同颜色标记,使得带有不同颜色的个体在群体中的空间分布直观且鲜明,极大地提升了实验数据的准确性。该技术方法不影响鱼类集群行为^[2],但对鱼类能量代谢的影响尚未见报道。

在鱼类能量学中,SMR通常以耗氧率来表征,指鱼类机体基本生理功能维持的最低能量代谢强度。SMR的高低影响着鱼类机体各种生理功能和个体适合度。温度、溶氧、食物丰度等环境因素均可影响鱼类的SMR^[3-4]。在控制多种环境因素一致的情况下,对鱼类进行颜色标记,这对于鱼类的SMR是否有影响以及颜色在鱼类体表的维持时间是判定该方法在有关研究中可行性的关键。

鲫(*Carassius auratus*)是一种广泛分布于中国各种水体的常见鲤科(Cyprinidae)鱼类,它不仅是经济养殖鱼类,而且也是科学研究的常见研究对象。为研究颜色标记法对鲤科鱼类SMR的影响,本研究以鲫幼鱼为实验对象,在颜色标记前、颜色标记后和摄食生长实验后分别测定该种鱼的SMR以及摄食期间的生长率,探讨颜色标记后实验鱼生长参数间的相关性,为鱼类能量学相关研究中颜色标记法的科学运用性提供数据支撑。

1 材料与方法

1.1 实验鱼来源及驯化

于2018年5月在重庆市合川区人工养殖基地购买鲫幼鱼,并置于规格为1.2 m×0.55 m×0.55 m、容积约250 L的实验室循环控温水槽驯化30 d。驯化期间以中国通威公司人工颗粒浮性饲料于每日9:00和21:00分

* 收稿日期:2019-03-01 修回日期:2019-07-18 网络出版时间:2019-09-26 11:24

资助项目:国家自然科学基金(No. 31300341);重庆市自然科学基金(No. cstc2017jcyjA0029);重庆市高等学校青年骨干教师资助计划项目(No. CQJW-02060301-1714);重庆师范大学青年人才拔尖培育计划项目(No. 02030307-00027)

第一作者简介:李若琳,女,研究方向为鱼类比较生理学,E-mail:1015672596@qq.com;通信作者:曾令清,男,副教授,博士,E-mail:lingqingzeng@hotmail.com

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20190926.1124.024.html>

别饱足投喂 1 次,并于投喂前 5 min 关闭充气泵以减少环境干扰,投喂 30 min 后用虹吸管清除残饵和粪便。将曝气 4 d 后的自来水作为更换用水,日换水约为驯养水体体积的 15%。用充气泵不断泵入空气使水槽中溶氧量接近饱和。驯化水温为 $(25.0 \pm 0.5) ^\circ\text{C}$,光周期为 14 h 光照:10 h 黑暗。

1.2 实验设计

驯化结束后挑选体质量相近的 40 尾鲫幼鱼作为实验对象。本研究设定了颜色标记前(第 0 d,测定 I)、颜色标记后(第 1 d,测定 II)及第 23 d(测定 III)共计 3 次 SMR 和形态参数的测定,具体操作如下:用溶氧仪(HQ_{30d},美国哈希公司)初次测定实验鱼的 SMR 后,将荧光标记试剂(Visible implant elastomer,美国西北科技公司)沿直线注入每尾鱼背部两侧的鳞片下方,长度为 0.5~1 cm;在此期间对实验鱼使用质量浓度为 $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MS-222 麻醉剂,并用碳酸氢钠作缓冲剂。次日,再次测定实验鱼的 SMR。每次 SMR 测定后对实验鱼的体质量与体长分别进行测量并记录。第 2 d 将单尾实验鱼移入多单元格循环水槽中已编号的单个养殖单元格,摄食生长期间多单元格循环水槽的所有养殖条件和投喂的饵料与驯养期间保持一致。在为期 21 d 的摄食期间,于每日早晚 9:00 和 15:00 对每尾鱼进行饱足投喂并记录摄食量。投喂 10 min 前关掉充气泵和循环水泵,投喂 1 h 后清除残饵和粪便。第 3 次实验鱼的 SMR 测定结束后,观察实验鱼背部颜色标记情况并统计。

实验鱼的生长参数包括特定生长率(Specific growth rate, SGR)、摄食率(Feeding intake, FI)和饵料效率(Feeding efficiency, FE),具体计算公式分别如下:

$$V_{\text{SGR}} = \frac{(\ln W_2 - \ln W_1)}{t} \times 100\%,$$

$$V_{\text{FI}} = \frac{2 \times 1\,000 \times m_d}{(W_2 + W_1) \times t},$$

$$V_{\text{FE}} = \frac{W_2 - W_1}{m_d} \times 100\%,$$

$$K = \frac{m}{l^3} \times 100.$$

其中: V_{SGR} , V_{FI} , V_{FE} 和 K 分别为 SGR(单位: d^{-1}), FI(单位: $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), FE 和肥满度(单位: $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$); W_1 为实验鱼初始体质量(单位:g), W_2 为实验鱼终末体质量(单位:g), t 为实验鱼摄食生长实验时间(单位:d), m_d 为单尾鱼摄入饲料干质量(单位:g), m 为实验鱼的体质量(单位:g), l 为实验鱼的体长(单位:cm)。

1.3 SMR 测定

采用流水式呼吸代谢仪测定鲫幼鱼 SMR。测定之前,将鱼装入呼吸室过夜适应并禁食以使消化道内食物消化吸收完毕,并使代谢强度恢复至摄食前水平。使用溶氧测定仪在第 2 日的 8:00 至 24:00 期间 1 h 测定 1 次耗氧率,将 17 个耗氧率中最小的 3 个耗氧率的平均值作为单尾鱼的 SMR。SMR 的计算公式如下:

$$V_{\text{SMR}} = c_{\text{O}_2} \times v.$$

式中, V_{SMR} 为 SMR(单位: $\text{mg} \cdot \text{h}^{-1}$), c_{O_2} 是有鱼呼吸室出水口与空白呼吸室的溶氧量差值(单位: $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), v 为呼吸室的水流量(单位: $\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$),由呼吸室出水口装满 50 mL 容量瓶计算获得。

SMR 校正方法:将单尾鱼的体质量和 SMR 转化为以 10 为底的对数,利用已对数化的数据得到回归方程和各个实验鱼 SMR 的残差,再利用下列方程将所有鱼的 SMR 校正至实验鱼的平均体质量(6.86 g , $n=40$)^[5]。

$$\log_{10} V_{\text{SMR}} = \log_{10} b + a \log_{10} m + \epsilon.$$

式中: a , b 为常数, m (单位:g) 为单尾鱼的体质量, ϵ 为 SMR 的残差。

形态参数测定时,利用直尺和天平测量实验鱼的体长和体质量,精度分别为 0.01 cm 和 0.01 g,以实验鱼头部上吻端到侧线鳞最后一鳞处末端的空间垂直距离作为体长。

1.4 数据分析

用 Excel 2010 软件对实验数据作常规计算,所得数据均以“平均值±标准误”表示。用 SPSS 19.0 软件进行统计分析:采用单因素方差分析考察实验鱼形态参数和 SMR 的测定时间差异;采用组内相关系数(Intraclass correlation coefficient, ICC)分析实验鱼表型参数的重复性;采用 Pearson 相关分析考察 SGR, FE 和 FI 两两之间的相关性。当 $p < 0.05$ 时,分析结果具有统计学意义。

2 结果

2.1 形态参数和 SMR

表 1 显示:颜色标记前后(测定 I, II),实验鱼的体质量、体长、肥满度均无明显差异;与颜色标记前的实验鱼相比,颜色标记后实验鱼原始 SMR 和校正后的 SMR 稍有降低,但有关差异不具有统计学意义。在摄食生长实验后(测定 III),实验鱼的体质量、体长和肥满度与该实验进行前相比分别增加了 22.4%,6.3%和 2.6%;与测定 I, II 中的实验鱼相比,测定 III 中实验鱼各项参数的变异系数均有所降低,但测定 III 中实验鱼的原始 SMR 与前两次测定的实验鱼相比均具有统计学意义上的差异($p < 0.05$)。3 次测定中,实验鱼体质量和 SMR 的变异系数均大于其他形态参数的变异系数,且经体质量校正后的 SMR 均与原始 SMR 存在差异。

表 1 鲫幼鱼的形态参数和 SMR

Tab. 1 The morphology and SMR of the juvenile *C. auratus*

测定名称	数据特征	体质量/g	体长/cm	肥满度/(g · cm ⁻³)	原始 SMR/(mg · h ⁻¹)	校正 SMR/(mg · h ⁻¹)
测定 I	平均值±标准误	6.40±0.18 ^a	6.45±0.06 ^a	2.36±0.01 ^a	0.79±0.04 ^{aA}	0.86±0.03 ^{aB}
	变异系数/%	18.0	5.8	4.4	35.6	23.5
	最大值	9.23	7.30	2.60	1.75	1.36
	最小值	4.88	5.85	2.01	0.30	0.41
	极值差异倍数	1.9	1.2	1.3	5.7	3.3
测定 II	平均值±标准误	6.37±0.18 ^a	6.45±0.06 ^a	2.35±0.02 ^a	0.68±0.05 ^{aA}	0.76±0.05 ^{aB}
	变异系数/%	18.0	5.8	4.5	42.6	38.2
	最大值	9.18	7.30	2.58	1.53	1.54
	最小值	4.86	5.85	2.00	0.17	0.59
	极值差异倍数	1.9	1.2	1.3	9.0	2.6
测定 III	平均值±标准误	7.80±0.21 ^b	6.85±0.06 ^b	2.41±0.01 ^b	1.08±0.04 ^{bA}	0.90±0.03 ^{aB}
	变异系数/%	17.3	5.7	3.7	26.1	19.3
	最大值	11.21	7.80	2.59	1.70	1.55
	最小值	5.47	6.10	2.20	0.61	0.60
	极值差异倍数	2.0	1.3	1.2	2.8	2.6

注:不同小写字母表示不同测定的某一参数差异具有统计学意义($p < 0.05$),不同大写字母表示同一测定下原始 SMR 和校正 SMR 的差异具有统计学意义。

对 3 次测定中的实验鱼而言,它们的体质量、体长、肥满度的 ICC 均大于 0.75,一致性为极佳;同时,它们的原始 SMR 的 ICC 值为 0.644,一致性为良好;然而,它们的校正 SMR 的 ICC 小于 0.4,一致性为差(表 2)。因此,实验鱼的体质量、体长、饱满度和原始 SMR 在整个研究中均保持较高的重复性($p < 0.001$),但它们的校正 SMR 则在整个研究中无重复性。

2.2 表型参数之间的相关性

研究表明,实验鱼的 SGR 与 FI 及 FE 均呈统计学意义上的正相关关系($p < 0.05$)(图 1a, b),但实验鱼的 FI 与 FE 的相关性无统计学意义(图 1c)。此外图 2 显示,实验鱼 SMR 的可塑性与自身生长性能(即 SGR)无统计学意义上的相关关系。

2.3 颜色标记的掉落情况

对摄食生长实验后实验鱼颜色标记掉落情况进行统计可知:颜色剩余少量和标记颜色完全脱落的实验鱼总数占实验鱼总数的 97.5%,因此颜色标记掉落的情况较为严重(表 3)。

表 2 鲫幼鱼表型参数的重复性

Tab. 2 Repeatability of phenotypic parameters of juvenile *C. auratus*

表型参数	ICC	p
体质量	0.926	<0.001
体长	0.949	<0.001
肥满度	0.790	<0.001
原始 SMR	0.644	<0.001
校正 SMR	0.318	0.076

3 讨论

3.1 颜色标记对鲫幼鱼 SMR 的影响

SMR 是鱼类能量代谢模型中最敏感的变量之一,对众多环境因素均有反应^[6]。例如,不同溶氧水平条件下鲫幼鱼的 SMR 与摄食代谢峰值即最大摄食能力呈正相关关系^[7];鲫幼鱼的 SMR 稳定性随呼吸室流量的增加而降低^[8]。本研究在控制多种环境因素一致的情况下,对进行颜色标记前后的实验鱼 SMR 作了测定。通过公式计算比较发现,颜色标记对鲫幼鱼的原始 SMR 和体质量校正后的 SMR 均无影响,表明该方法对鲫幼鱼短期内的 SMR 无影响,因而可用于鱼类生理学实验研究。此外,由于 SMR 在一定程度上与鱼类机体生理功能密切相关,然而鉴于颜色标记对实验鱼的 SMR 无影响,故可以进一步推断,颜色标记对实验鱼其他生理功能(如摄食消化能力)的影响也可忽略不计。

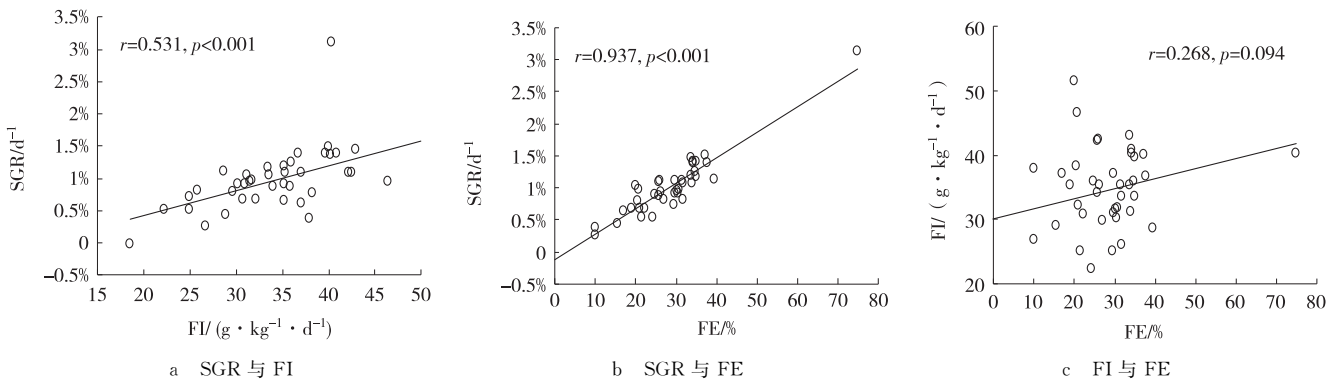


图 1 鲫幼鱼生长参数之间的相关性

Fig. 1 Correlations of growth performance parameters of juvenile *C. auratus*

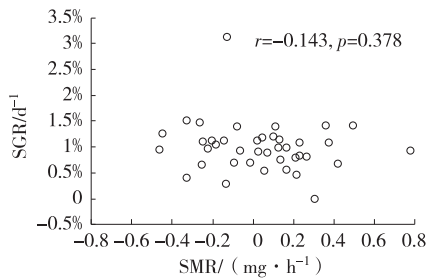


图 2 鲫幼鱼 SMR 可塑性与 SGR 的关系

Fig. 2 Correlation between SMR change and SGR of juvenile *C. auratus*

表 3 实验结束后鲫幼鱼颜色标记的掉落情况

Tab. 3 Dropping of color labeling of juvenile *C. auratus* after experiment

标记情况	尾数	占总数比例/%
颜色醒目	1	2.5
颜色少量	24	60.0
无颜色标记	15	37.5

3.2 鲫幼鱼代谢可塑性与生长性能的关系

在鱼类 SMR 与生长性能关系的研究中,不同研究的实验结果存在明显差异。在实验室中,饱足摄食个体的 SMR 与生长率通常呈正相关关系^[9],如银大麻哈鱼(*Oncorhynchus kisutch*)^[10]、马苏大麻哈鱼(*Oncorhynchus masou*)^[11]、鳊(*Parabramis pekinensis*)^[12]和大西洋鲑(*Salmo salar*)^[13-14]。然而,鳟(*Salmo trutta*)在野外环境中的 SMR 与生长率无相关关系或呈负相关关系^[8]。此外,在考察鱼类的 SMR 可塑性与生长率的关联时,有研究发现,在正常摄食情况下中华倒刺鲃(*Spinibarbus sinensi*) SMR 的变化量与 SGR 呈正相关关系^[15]。而在本研究中,鲫幼鱼 SMR 的变化量和 SGR 无统计学意义上的相关关系,这有别于上述研究。因此,SMR 及它的变化量与生长率的关系因鱼种类的不同而有所差异。此外,有关锦鲫和鲫的研究结果显示,二者摄食期间的 SGR 分别集中于 0.5%~2.5% d⁻¹和 1%~2% d⁻¹^[16-17],而本研究中鲫幼鱼的 SGR 也在上述研究的 SGR 范围内。

综上所述,本研究发现颜色标记前后鲫幼鱼的 SMR 无明显差异,且重复性较高,因此该方法在短期内对鲫幼鱼的 SMR 无影响。颜色标记在鱼类生态学研究具有较高的可行性,有利于研究人员在不影响鱼类生理功能的前提下有效地观察个体在集群中的空间分布和运动轨迹。然而,所标记颜色在实验后期脱落情况较严

重,说明颜色标记不太适合运用于时期较长的研究,这可能是该方法的一个弊端。因此,有关鱼类体外标记的颜色持久性问题值得关注。

参考文献:

- [1] BIRO P A, STAMPS J A. Do consistent individual differences in metabolic rate promote consistent individual differences in behavior? [J]. *Trends in Ecology and Evolution*, 2010, 25(11): 653-659.
- [2] FINSTAD A G, FORSETH T, UGEDAL O, et al. Metabolic rate, behaviour and winter performance in juvenile Atlantic salmon [J]. *Functional Ecology*, 2007, 21(5): 905-912.
- [3] 李想, 林小涛, 宋波澜, 等. 流量对红鳍银鲫幼鱼游泳状态的影响 [J]. *动物学杂志*, 2010, 45(2): 126-133.
LI X, LIN X T, SONG B L, LI D. Effects of water velocities on swimming performances of juvenile tinfoil barb *Barbodes schwanenfeldi* [J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2010, 45(2): 126-133.
- [4] FRY F E J. The Effect of environmental factors on the physiology of fish [J]. *Fish Physiology*, 1971, 6(1): 1-22.
- [5] 凌鸿, 冯琪, 陈月琴, 等. 成对鲫鱼游泳行为与标准代谢率的关系 [J]. *重庆师范大学学报(自然科学版)*, 2018, 35(5): 41-47.
LING H, FENG Q, CHEN Y Q, et al. Correlations between standard metabolic rate and swimming behavior in paired juvenile *Carassius auratus* [J]. *Journal of Chongqing Normal University (Natural Science)*, 2018, 35(5): 41-47.
- [6] KADYE W T, NGONIDZASHE A G M, CHRISTOPHER H D M, 等. 马拉维 Nyika 高原三种溪流鱼类的生境类型 [J]. *动物学报*, 2008, 54(1): 67-76.
KADYE W T, NGONIDZASHE A G M, CHRISTOPHER H D M, et al. Habitat associations of three stream fishes on a montane plateau (Nyika plateau, Malawi) [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2008, 54(1): 67-76.
- [7] CHEN B J, CAO Z D, FU S J. Hypoxia impairs the digestive advantage of individual southern catfish (*Silurus meridionalis*) with high resting metabolic rates and postprandial metabolic responses [J]. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 2014, 47(3): 197-204.
- [8] 王蕾, 付世建, 曾令清. 流量和时间对中华倒刺鲃幼鱼标准代谢率测定的影响 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2017, 39(9): 59-65.
WANG L, FU S J, ZENG L Q. The effects of flow rate and time on the measurement of standard metabolic rate in juvenile qingbo (*Spinibarbus sinensis*) [J]. *Journal of Southwest University (Natural Science Edition)*, 2017, 39(9): 59-65.
- [9] ÁLVAREZ D, NICIEZA A G. Is metabolic rate a reliable predictor of growth and survival of brown trout (*Salmo trutta*) in the wild? [J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2005, 62(3): 643-649.
- [10] VANLEEUEWEN T E, ROSENFELD J S, RICHARDS J G. Effects of food ration on SMR: influence of food consumption on individual variation in metabolic rate in juvenile salmon (*Oncorhynchus kisutch*) [J]. *Journal of Animal Ecology*, 2012, 81(2): 395-402.
- [11] YAMAMOTO T, UEDA H, HIGASHI S. Correlation among dominance status, metabolic rate and otolith size in masu salmon [J]. *Journal of Fish Biology*, 1998, 52(2): 281-290.
- [12] 曾令清, 付成, 奚露, 等. 鳊幼鱼能量代谢和个性行为的个体变异及表型关联 [J]. *生态学报*, 2017, 37(14): 4807-4816.
ZENG L Q, FU C, XI L, et al. Phenotypic correlations and individual variation of energy metabolism and personality in juvenile Chinese bream (*Parabramis pekinensis*) [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2017, 37(14): 4807-4816.
- [13] MCCARTHY I D. Temporal repeatability of relative standard metabolic rate in juvenile Atlantic salmon and its relation to life history variation [J]. *Journal of Fish Biology*, 2000, 57(1): 224-238.
- [14] CUTTS C J, METCALFE N B, TAYLOR A C. Aggression and growth depression in juvenile Atlantic salmon: the consequences of individual variation in standard metabolic rate [J]. *Journal of Fish Biology*, 1998, 52(5): 1026-1037.
- [15] ZENG L Q, WANG L, WANG G N, et al. The relationship between growth performance and metabolic rate flexibility varies with food availability in juvenile qingbo (*Spinibarbus sinensis*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 2017, 212: 56-63.
- [16] 刘欢, 李秀明, 付世建, 等. 锦鲤幼鱼标准代谢率与生长性能的关联 [J]. *水生生物学报*, 2016, 40(4): 836-842.
LIU H, LI X M, FU S J, et al. The correlations between standard metabolic rate and growth performance in juvenile gold fish [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2016, 40(4): 836-842.
- [17] ZENG L Q, ZHANG A J, KILLEN S S, et al. Standard metabolic rate predicts growth trajectory of juvenile Chinese crucian carp (*Carassius auratus*) under changing food availability [J]. *Biology Open* 2017, 6(9): 1305-1309.

Animal Sciences

The Effect of Colour Tagging on the Standard Metabolic Rate in Juvenile *Carassius auratus*

LI Ruolin, TANG Qingqing, WANG Meng, YANG Weijia, ZENG Lingqing

(Chongqing Key Laboratory of Animal Biology, Laboratory of Evolutionary Physiology and Behaviour,
Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract: [Purposes] To investigate the effect of color tagging on the standard metabolic rate (SMR) in juvenile *Carassius auratus*. [Methods] Under the condition of $(25.0 \pm 0.5) ^\circ\text{C}$, 40 juvenile *C. auratus* with similar health condition and size were selected as experimental fish to examine the responses of SMR and morphology (i. e. , body mass and body length) of juvenile fish before color tagging (0 d), after color tagging (1 d) and the growth period (23 d). During the feeding course (2~22 d), each fish was fed twice daily (9:00 and 15:00) and food consumed by fish was recorded each day. [Findings] No significant difference in SMR was found between before and after color tagging. However, the body mass, body length, condition factor (CF) and SMR of the juvenile *C. auratus* all increased during the feeding period ($p < 0.05$). Excepted for the standardized SMR, the body mass, body length, CF and original SMR of the juvenile *C. auratus* were repeatable throughout the experimental process. The specific growth rate (SGR) of individuals positively correlated with both feeding intake and feeding efficiency whereas no relationship was found between feeding intake and feeding efficiency. The SGR of experimental fish did not correlate with change in SMR. [Conclusions] The present study found that color tagging had no influence on the SMR of the juvenile *C. auratus*, suggesting that method of the color tagging can be applied to fish scientific biological research due to its feasibility and convenience. The phenotypic parameters of juvenile *C. auratus* have high repeatability.

Keywords: color tagging; standard metabolic rate; feeding intake; specific growth rate; feeding efficiency; *Carassius auratus*

(责任编辑 方 兴)

白鹭基因组微卫星分布规律研究*

黄杰¹, 杨波^{2,3}, 贾银平¹, 杨承忠⁴

(1. 商丘师范学院生物与食品学院, 河南商丘 476000; 2. 中国大熊猫保护研究中心, 四川都江堰 611830;

3. 大熊猫国家公园珍稀动物保护生物学国家林业和草原局重点实验室, 四川都江堰 611830;

4. 重庆师范大学生命科学学院重庆市动物生物学重点实验室, 重庆 401331)

摘要:【目的】研究白鹭(*Egretta garzetta*)的全基因组微卫星分布规律。【方法】利用生物信息学方法对已报道的白鹭全基因组进行查询和分析。【结果】白鹭全基因组中1~6个碱基重复的微卫星有255 630个,序列总长度为4 282 844 bp,占全基因组序列长度的0.37%。不同重复类型的微卫星中,单碱基的数量最多,有207 108个,占全部类型的81.0%;然后依次是二碱基、三碱基、四碱基、五碱基、六碱基,分别占全部类型的6.4%,5.3%,4.9%,2.0%和0.4%。A,C,AC,AT和AG是白鹭基因组微卫星序列中重复数量较多的拷贝类型,占全部重复类型的87.4%。在白鹭基因组中,按降序排列,重复类型出现次数超过1 000次的有17个,分别是T,A,AT,G,C,AC,GT,ATT,AAT,ATTT,AGG,AAAC,CCT,AAAT,CT,GTTT和AG,占全部微卫星数量的92.7%。【结论】研究结果对白鹭微卫星的筛选及深入研究提供了数据支持。

关键词:白鹭;微卫星;基因组;分布规律

中图分类号:Q953

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2019)05-0066-06

白鹭(*Egretta garzetta*)为鹤形目(Ciconiiformes)鹭科(Ardeidae)白鹭属(*Egretta*)鸟类,又有春锄、白鸟等称谓;该鸟身形纤瘦,全身白色,为全球性分布的水鸟,常见于江河、湖泊及滩涂等地。白鹭主要分布于亚洲、非洲、欧洲中部和南部、大洋洲等区域,在中国则主要分布在四川、陕西南部、河南等地。目前,有关白鹭的研究主要集中于生态环境指示作用^[1]、种群的繁殖习性研究^[2]、个体识别^[3]等方面。

微卫星(Microsatellite)又称简单重复序列(Simple sequence repeat)或短串联重复(Short tandem repeat),指基因组中以少数几个(通常为1~6个)核苷酸为短重复单元构成的串联长度为数十个核苷酸的DNA重复序列。由于微卫星标记具有高效以及稳定的特点,因此被广泛应用于遗传连锁图谱的构建、遗传育种等领域。在研究有关动物遗传特征的研究中,可利用微卫星标记进行物种间、物种内甚至个体间的亲缘关系分析,如遗传育种^[5]、亲子鉴定^[6]、遗传多样性分析等^[7]。目前最常见的获取微卫星的方法有如下3种:1)通过查找公共数据库获取微卫星位点;2)利用物种间遗传距离相临近的交叉转移扩增;3)通过基因组DNA筛选获取微卫星。

目前鹭科鸟类中有关微卫星标记研究主要集中于位点的筛选^[8-9],有关基因组微卫星分布情况并未见报道。本研究利用生物信息学方法搜索白鹭的全基因组序列,并对基因组中的微卫星进行了分析,以便为今后白鹭微卫星标记的筛选、遗传多样性、遗传育种等方面的研究提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 白鹭基因组序列

白鹭全基因组序列来源于网站 <http://www.diark.org/diark/species>,基因组大小为1 151.9 Mb,以FASTA格式保存。

* 收稿日期:2019-03-06 修回日期:2019-08-26 网络出版时间:2019-09-26 11:24

资助项目:国家自然科学基金(No. 31501845);重庆市自然科学基金(No. cstc2017jcyjAX0165;No. cstc2018jcyjAX0738);重庆市留学人员回国创业创新支持计划(No. cx2018108);商丘师范学院高层次人才科研启动项目(No. 50013901)

第一作者简介:黄杰,女,讲师,博士,研究方向为动物学,E-mail:huangjie66666@163.com;通信作者:杨承忠,男,副教授,博士,E-mail:drczyang@126.com

网络出版地址:<http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20190926.1123.006.html>

1.2 微卫星相关术语的定义

为了完全统计重复序列,特将与重复序列有关的 4 个术语进行说明。

1) 重复类型:指每个重复序列中核心重复单元是由多少碱基(bp)组成。依据核心重复单元的碱基数的多寡,可将微卫星分为单碱基、二碱基、三碱基、四碱基、五碱基和六碱基共 6 种类型。

2) 重复拷贝数:指每个微卫星重复序列中核心单元出现的次数,比如(AACA)₂₈,这个重复序列的重复拷贝数就是 28。

3) 重复拷贝类别:指每个重复类型由哪几个碱基构成,比如四碱基重复类型 AACA 和 AAGA 分别属于不同的重复拷贝类别,而 AAAC,AACA 则属于 1 个重复拷贝类别。

4) 重复数目:指在基因组中,每个重复类型的碱基数目。

1.3 统计软件

对白鹭基因组微卫星的搜索通过微卫星搜索及统计软件 MSDB v2.4^[10]来完成,此软件用 Perl 程序语言编程,界面友好,操作简便快捷,可以准确辨认并建立物种的微卫星序列资源库,并集成了微卫星分类及统计各种功能,在不同物种微卫星研究中具有广泛应用^[11-17]。有关统计标准设置如下:单碱基重复序列中,筛选的拷贝数大于或等于 12;二碱基重复序列中,筛选的拷贝数大于或等于 7;三碱基重复序列中,筛选的拷贝数大于或等于 5;四碱基、五碱基和六碱基重复序列中,筛选的拷贝数大于或等于 4。

2 结果

2.1 基因组中不同重复类型微卫星的基本情况

表 1 显示:在白鹭基因组中共发现 255 630 个微卫星序列,总长度为 4 282 844 bp,占全基因长度的 0.37%;总丰度为 3 718.07 bp·Mb⁻¹,总频率为 221.92 个·Mb⁻¹。从表 1 可以明显看出:单碱基类型的数量最多;然后依次为二碱基、三碱基、四碱基和五碱基类型;数量最少的是六碱基类型。同样地,白鹭不同重复类型微卫星的总长、丰度和频率也遵循上述规律(表 1)。此外在白鹭的基因组中,通过降序规律排列,可以发现:微卫星重复基本类型出现频率超过 1 000 次的有 17 种,分别是 T, A, AT, G, C, AC, GT, ATT, AAT, ATTT, AGG, AAAC, CCT, AAAT, CT, GTTT 和 AG,它们占全部微卫星数量的 92.7%;在基因组中,微卫星重复基本类型出现频率超过 100 次的有 66 种,占基因组全部总数的 98.5%。

表 1 白鹭基因组中不同重复类型微卫星的基本信息

Tab. 1 Distribution of SSR of different repeat type in genome of *E. garzetta*

重复类型	数量/个	总长/bp	频率/(个·Mb ⁻¹)	丰度/(bp·Mb ⁻¹)
单碱基	207 108(81.0%)	3 246 092	179.80	2 818.03
二碱基	16 346(6.4%)	282 546	14.19	245.29
三碱基	13 448(5.3%)	251 151	11.67	218.03
四碱基	12 614(4.9%)	243 324	10.95	211.24
五碱基	5 075(2.0%)	201 915	4.41	175.29
六碱基	1 039(0.4%)	57 816	0.90	50.19
总计	255 630(100.0%)	4 282 844	221.92	3 718.07

注:“数量”一列中括号内的数据为某一重复类型微卫星数量占微卫星总数量的百分比。

2.2 不同重复类型微卫星重复序列的数量

白鹭基因组中不同重复类型微卫星的出现次数范围有较大差异,重复次数最少的仅 4 次,重复次数最多的(TCCTT)达 380 次。重复 4~6 次的有 855 个,占全部类型微卫星数量的 49.5%;重复 7~15 次的有 622 个,占全部类型微卫星数量的 36.0%;重复 16~30 次的有 143 个,占全部类型微卫星数量的 8.3%;重复 31~40 次的有 58 个,占全部类型微卫星数量的 3.4%;重复 41~380 次的有 49 个,占全部类型微卫星数量的 2.8%。在白鹭基因组中,不同重复类型微卫星的主要重复次数也不同:单碱基类型中以 12~26 个重复的居多,占全部单碱基类型的 96.2%;二碱基类型中以 7~10 个重复居多,占全部二碱基类型的 85.2%;三碱基类型中以 4~7 个重复的居多,占全部三碱基类型的 85.0%;四碱基类型中以 4~7 个重复的居多,占全部四碱基类型的 95.8%;五碱基类型中以 4~10 个重复居多,占全部五碱基类型的 88.9%;六碱基类型中以 4~8 个重复居多,占全部六碱基类型的 83.6%。但从整体上来看,白鹭基因组中微卫星序列重复次数在 4~40 之间的居多,占全部类型微卫星重复序列数量的 95.8%(图 1)。

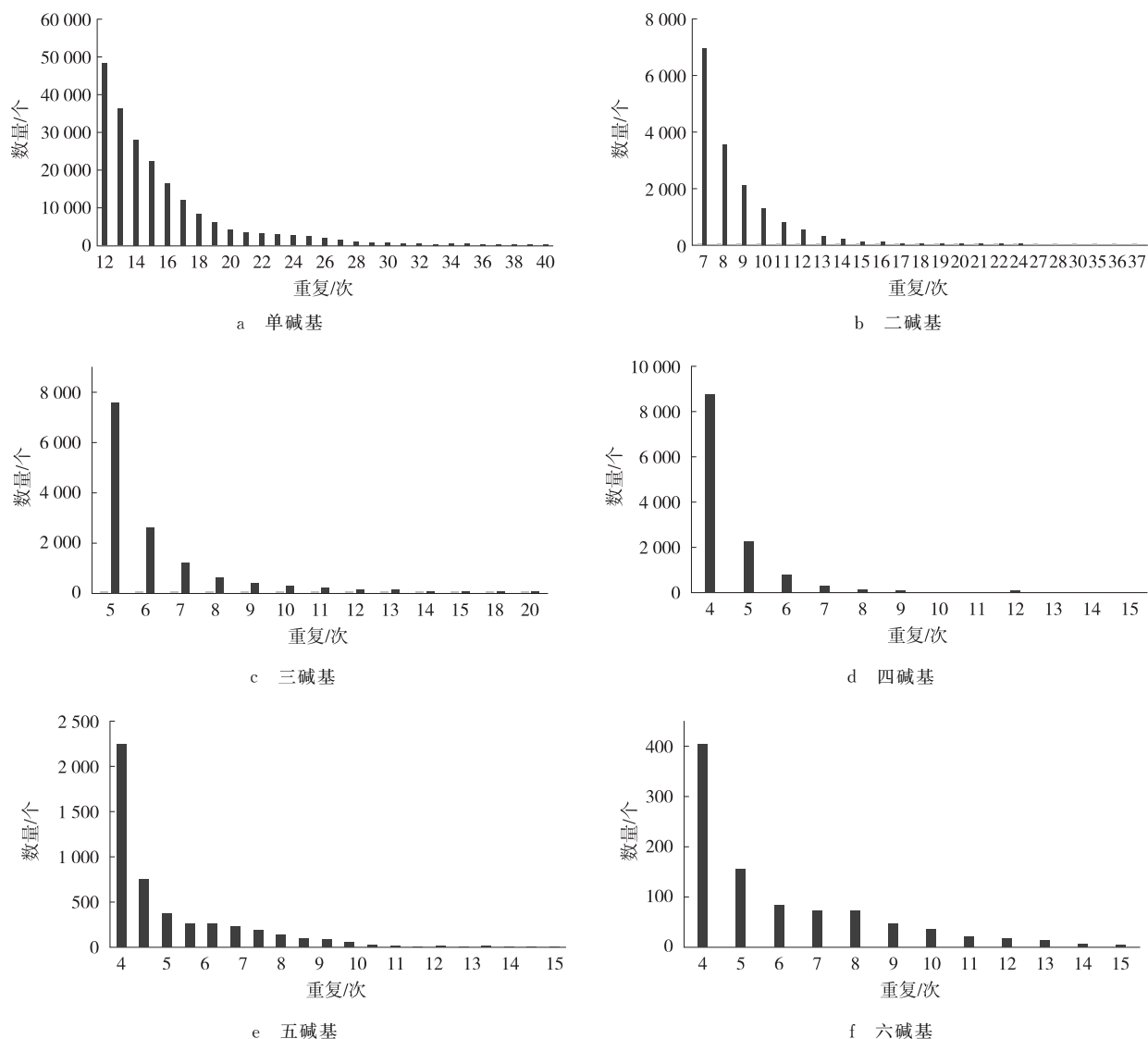


图 1 单碱基至六碱基重复类型的拷贝数的数量分布

Fig. 1 The number distribution of copy numbers in 1~6 bp repeats

2.3 各重复拷贝类别的数量

表 2 显示: 白鹭基因组中出现数量最多单碱基重复拷贝类别是 A, 有 196 318 个, C 相对最少, 仅有 10 790 个。二碱基重复类型中最多的是 AC, 有 8 052 个; 其次是 AT 和 AG, 分别有 5 560 和 2 721 个; 最少的是 GC 仅有 12 个。

表 2 白鹭基因组中主要重复类型微卫星的拷贝类别数量

Tab. 2 Number of the main repeat type of SSR in genome of *E. garzetta*

重复类型	拷贝类别	数量/个	重复类型	拷贝类别	数量/个
单碱基	A	196 318(94.80%)	三碱基	AAT	4 623(34.38%)
	C	10 790(5.20%)		ACC	1 079(8.02%)
总计	207 108(100.00%)	ACG		592(4.40%)	
二碱基	AC	8 053(49.26%)		ACT	645(4.80%)
	AG	2 721(16.65%)		AGC	625(4.65%)
	AT	5 560(34.02%)		AGG	2 970(22.09%)
	CG	12(0.07%)	AGT	671(4.98%)	
总计	16 346(100.00%)	CCG	55(0.41%)		
三碱基	AAC	1 663(12.37%)	总计	13 448(100.00%)	
	AAG	525(3.90%)			

注:“数量”一列中括号内的数据为某一重复类型微卫星某一拷贝类别数量该重复类型微卫星总数的百分比。

三碱基重复类型中,最多的是 AAT,有 4 623 个,其次是 AGG,有 2 970 个,最少的是 CCG,仅有 55 个。

3 讨论

3.1 全基因组上微卫星序列的分布特性

随着生物信息学技术飞速发展,从数据库中可获得的生物基因组序列也逐渐增多。在基因组水平上来分析各个物种的微卫星序列,不仅可以认识到各个物种的微卫星序列特征,而且还可以揭示微卫星在生物基因组内的作用。本研究通过在网站 <http://www.diark.org/diark/species> 中下载白鹭基因组,并通过 MSDB^[10] 软件搜索和分析了白鹭基因组中存在的微卫星序列,在 1 151.9 Mb 全基因组序列中共统计出微卫星位点 255 630 个,所有的微卫星序列总长 4 282 844 bp,占全基因组序列长度的 0.37%,与虎皮鹦鹉 (*Melopsittacus undulatus*)^[11]、林麝 (*Moschus berezovskii*)^[12]、红原鸡 (*Gallus gallus*)^[13] 微卫星序列占全基因组序列长度的比例相近(三者依次分别为 0.41%,0.42%和 0.49%),但是与大熊猫 (*Ailuropoda melanoleuca*)、北极熊 (*Ursus maritimus*)^[14] 以及猪 (*Sus scrofa*)^[15] 的这一比例相差较大(三者依次分别为 0.64%,0.79%和 0.85%)。

白鹭基因组中单碱基重复类型在所有的微卫星重复类型中所占的比例最高,为 81.0%,并且单碱基类型中以 (A)_n 和 (T)_n 为主,占 94.8%,这与其他物种如猪^[15]、人 (*Homo sapiens*)^[16]、大鼠 (*Rattus norvegicus*)^[17] 等哺乳动物的有关研究结果相符合;而果蝇 (*Drosophila melanogaster*)^[16] 中两碱基类型所占比例最高,黑粉菌 (*Ustilago maydis*)^[18] 低等生物中三碱基类型所占比例最高。白鹭二碱基类型微卫星数量有 16 346 个,占全部微卫星重复序列数量的 6.4%;其中 AC 数量最多,为 8 053 个;GC 含量最少,仅有 12 个。这与大鼠^[17]、大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)^[19]、牛 (*Bos taurus*)^[20]、绵羊 (*Ovis aries*)^[20]、小鼠 (*Mus musculus*)^[21] 二碱基类型微卫星中 AC 的分布规律相同,与红原鸡^[13] 的二碱基类型微卫星中 AT 所占比例最高的结果不相同。此外,白鹭三碱基类型微卫星数量有 13 448 个,占全部微卫星重复序列的 5.3%,其中 AAT 所占比例最高,同酵母^[18] 的三碱基类型微卫星中 AAT 所占比例最高的结果相同。然而,人类基因组的三碱基类型微卫星含有较多的 AAT 和 AAC,果蝇^[16] 基因组的该类微卫星含有较多的 AGC。因此,不同物种中微卫星的分布规律存在着一定的差异,但这一点是否与物种的进化有关,以及它和不同生物的基因表达与调控是否存在关联,仍需进一步研究。

3.2 二碱基重复类型的分布特征

对小鼠^[21]、猪^[15]、牛和绵羊^[20] 的基因组微卫星分析结果表明:在二碱基类型微卫星中,AC 所占比例最高,而红原鸡^[13] 的基因组这一类型的微卫星中 AT 所占比例最高。本研究结果则显示,白鹭二碱基类型微卫星中 AC 所占比例最高,它的数量占全部二碱基类型微卫星数量的 49.26%。上述差异可能由不同的物种中占优势的二碱基类型有所差异而导致。而二碱基类型微卫星中 GC 所占比例在已研究的物种中都是较少的。有研究发现,GC 所占比例高的物种,它的基因组内微卫星所占比例也较低。Shorderet 等人^[22] 研究了 6 种脊椎动物的基因组后,给出的解释是:由于基因组中的 CpG 甲基化,因而使它成为一个易突变的点;而甲基化的胞苷酸 C 又容易在脱氨基的作用下转变为胸腺嘧啶 T;然而 GC 又是保证 DNA 热力学所必备的。由此导致的结果是:GC 在其中越来越少,相对应的 TG 所占比例逐渐增加。这个解释可以在某些程度上阐明为何在人类及某些生物基因组二碱基类型微卫星中,AC 重复较多。虽然微卫星中 GC 所占比例相对较低,但是研究表明,这一拷贝类别在基因组中依然起着重要的作用,Griffiths 等人^[23] 发现,胸苷激酶的 G(n) 突变参与了单纯疱疹病毒的再活化。由此推断,本研究中白鹭二碱基类型微卫星中 GC 所占比例较少可能与上述原因有一定的关系,因为与之相对应的突变后的 AC 所占比例在二碱基类型中是最高的。然而,白鹭基因组的二碱基类型微卫星中 GC 所占比例较少的具体原因仍需要进一步研究。

参考文献:

- [1] 夏秋焯,倪才英,赵中华,等. 鄱阳湖夏候鸟小白鹭对环境样品中重金属的富集研究[J]. 长江流域资源与环境,2014,23(11):1540-1544.
- [2] 韩庆,梁瑜,何超. 湖南花岩溪白鹭繁殖习性研究[J]. 四川动物,2008,27(4):594-598.
- XIA Q Y, NI C Y, ZHAO Z H, et al. Research on enrichment of heavy metals in little egret of the Poyang lake[J]. Resources and Environment in the Yangtze Basin, 2014, 23(11):1540-1544.
- HAN Q, LIANG Y, HE C. Breeding characteristics of *Egretta garzetta* in Huayanxi, Hunan province[J]. Sichuan Journal of Zoology, 2008, 27(4):594-598.

- [3] 管昊,林清贤,周晓平,等. 白鹭脱落羽毛的微卫星个体识别研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版),2013,52(5):710-717.
GUAN H,LIN Q X,ZHOU X P, et al. Microsatellite individual identification for moulted feathers in *Egretta garzetta*[J]. Journal of Xiamen University (Natural Science),2013,52(5):710-717.
- [4] 林清贤,周晓平,方文珍,等. 中国 6 种白色鹭科鸟类的系统归属研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版),2010,49(1):83-86.
LIN Q X,ZHOU X P,FANG W Z, et al. Phylogenetic relationships of 6 species egrets with white plumes in China [J]. Journal of Xiamen University (Natural Science),2010,49(1):83-86.
- [5] QI W, CHEN X, FANG P, et al. Genomic and transcriptomic sequencing of *Rosa hybrida* provides microsatellite markers for breeding, flower trait improvement and taxonomy studies[J]. BMC Plant Biology,2018,18(1):119.
- [6] YAMAMOTO S, KOMASU H, KITAURA J, et al. Development of 11 microsatellite markers and paternity analysis in the invasive apple snail *Pomacea canaliculata* [J]. Venus (Journal of the Malacological Society of Japan),2018,76(1/2/3/4):79-85.
- [7] BARBIAN H J, CONNELL A J, AVITTO A N, et al. CHIIMP: an automated high-throughput microsatellite genotyping platform reveals greater allelic diversity in wild chimpanzees[J]. Ecology and Evolution,2018,8(16):7946-7963.
- [8] HUANG X, ZHOU X, CHEN M, et al. Isolation and characterization of microsatellite loci in vulnerable Chinese egret (*Egretta eulophotes*: aves)[J]. Conservation Genetics,2010,11(3):1211-1214.
- [9] HILL A, GREEN M C. Characterization of 12 polymorphic microsatellites for the reddish egret, *Egretta rufescens* [J]. Conservation Genetics Resources,2011,3(1):13-15.
- [10] DU L M, LI Y Z, ZHANG X Y, et al. MSDB: A user-friendly program for reporting distribution and building databases of microsatellites from genome sequences[J]. Journal of Heredity,2013,104(1):154-157.
- [11] 黄杰,原宝东,杨承忠. 虎皮鸚鵡全基因组中微卫星分布规律研究[J]. 野生动物学报,2017,38(3):422-426.
HUANG J, YUAN B D, YANG C Z. Distribution regularities of microsatellites in the *Melopsittacus undulatus* genome[J]. Chinese Journal of wildlife,2017,38(3):422-426.
- [12] 卢婷,王晨,杜超,等. 林麝全基因组微卫星分布规律研究[J]. 四川动物,2017,36(4):420-424.
LI T, WANG C, DU C, et al. Distribution regularities of microsatellites in *Moscsus berezovskii* genome[J]. Sichuan Journal of Zoology,2017,36(4):420-424.
- [13] 黄杰,杜联明,李玉芝,等. 红原鸡全基因组中微卫星分布规律研究[J]. 四川动物,2012,31(30):358-363.
HUANG J, DU L M, LI Y Z, et al. Distribution regularities of microsatellites in *Gallus gallus* genome [J]. Sichuan Journal of Zoology,2012,31(30):358-363.
- [14] 李午佼,李玉芝,杜联明,等. 大熊猫和北极熊基因组微卫星分布特征比较分析[J]. 四川动物,2014,33(4):874-878.
LI W J, LI Y Z, DU L M, et al. Comparative analysis of microsatellites sequence distribution in the genome of giant panda and polar bear[J]. Sichuan Journal of Zoology,2014,33(4):874-878.
- [15] 戚文华,蒋雪梅,肖国生,等. 猪全基因组中微卫星分布规律[J]. 畜牧与兽医学,2014,46(8):9-12.
QI W H, JIANG X M, XIAO G S, et al. Distribution regularities of microsatellites in the pig genome [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica,2014,46(8):9-12.
- [16] KATTI M V, RANJEKAR P K, GUPTA V S, et al. Differential distribution of simple sequence repeats in eukaryotic genome sequences [J]. Molecular Biology and Evolution,2001,18(7):1161-1167.
- [17] 涂飞云,刘晓华,杜联明,等. 大鼠全基因组微卫星分布特征研究[J]. 江西农业大学学报,2015,37(4):708-711.
TU F Y, LIU X H, DU L M, et al. Distribution characteristic of microsatellites in the rat genome [J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis,2015,37(4):708-711.
- [18] KARAOGLU H, LEE C M, MEYER W. Survey of simple sequence repeats in completed fungal genomes [J]. Molecular Biology & Evolution,2005,22(3):639-649.
- [19] 叶华,任鹏,刘洋,等. 大黄鱼微卫星标记的开发及其遗传方式分析[J]. 水生生物学报,2012,36(6):1156-1163.
YE H, REN P, LIU Y, et al. Isolation and genetic analysis of microsatellite markers for *Larimichthys crocea* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica,2012,36(6):1156-1163.
- [20] 戚文华,蒋雪梅,肖国生,等. 牛和绵羊全基因组微卫星序列的搜索及其生物信息学分析[J]. 畜牧与兽医学报,2013,44(11):1724-1733.
QI W H, JIANG X M, XIAO G S, et al. Seeking and bioinformatics of microsatellites sequence in the genome of cow and sheep [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica,2013,44(11):1724-1733.
- [21] 童晓玲,代方银,李斌,等. 小鼠基因组中的微卫星重复序列的数量、分布和密度[J]. 动物学报,2006,52(1):138-152.
TONG X L, DAI F Y, LI B, et al. Microsatellite repeats in mouse: abundance, distribution and density [J]. Acta Zoologica Sinica,2006,52(1):138-152.
- [22] SCHORDERET D F, GARTER S M. Analysis of CpG

suppression in methylated and species [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, 1992, 89(3): 957-961.

[23] GRIFFITHS A, LINK M A, FURNESS C L, et al. Low-

level expression and reversion both contribute to reactivation of herpes simplex virus drug-resistant mutants with mutations on homopolymeric sequences in thymidine kinase [J]. Journal of Virology, 2006, 80(13): 6568-6574.

Animal Sciences

The Distribution Regularities of Microsatellites in *Egretta garzetta* Genome

HUANG Jie¹, YANG Bo^{2,3}, JIA Yinping¹, YANG Chengzhong⁴

(1. College of Biology and Food, Shangqiu Normal University, Shangqiu Henan 476000;

2. China Conservation and Research Centre for the Giant Panda, Dujiangyan Sichuan 611830;

3. Key Laboratory of State Forestry and Grassland Administration on Conservation Biology of Rare Animals in The Giant Panda National Park, Dujiangyan Sichuan 611830; 4. Chongqing Key Laboratory of Animal Biology, College of Life Science, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract: [Purposes] It is focused on the distribution regularities of microsatellites in *Egretta garzetta*. [Methods] The whole genome sequences of *E. garzetta* were analyzed by bioinformatics methods. [Findings] The results showed that: Microsatellite (simple sequence repeat, SSR) with 1~6 bp nucleotide motifs were detected in the *E. garzetta* were 255 630 loci, 4 282 844 bp in length, which account for 0.36% of the whole genome sequences. These 207 108 mononucleotide microsatellites, which accounted for 81% of all the different repeat types, is the most abundant type. Followed by dinucleotide, trinucleotide, tetranucleotide, pentanucleotide, hexanucleotide microsatellites which accounted for 6.4%, 5.3%, 4.9%, 2%, and 0.4%, respectively. A, C, AC, AT, and AG were predominate in *E. garzetta* genome, accounted for 87.4% all together. The repeat times of T, A, AT, G, C, AC, GT, ATT, AAT, ATTT, AGG, AAAC, CCT, AAAT, CT, GTTT, and AG were more than 1 000 times, which accounted for 92.7% all together. [Conclusions] This data provided here will give a light on screening and further research of *E. garzetta* microsatellites.

Keywords: *Egretta garzetta*; microsatellite; genomic; distribution regularities

(责任编辑 方 兴)

单养与群养鲤幼鱼的静止代谢、游泳能力与生长性能*

夏丹阳, 沈 聪, 李 倩, 朱晓玲, 罗毅平, 庞 旭

(西南大学 淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室, 重庆 400715)

摘要:【目的】考察鲤(*Cyprinus carpio*)幼鱼的维持耗能、游泳能力与生长性能在单独和群体喂养间的差异。【方法】在25℃下,将鲤幼鱼分成单养组和群养组,进行为期21 d的摄食生长养殖,然后测定每尾鱼的静止代谢率(RMR)、匀加速最大游泳速度(U_{cat}),同时计算每组鱼的特定生长率(SGR)、摄食率(FR)和转化率(FE)。【结果】单养组RMR明显比群养组RMR更低,两者差异具有统计学意义($p=0.006$);两组RMR的变异系数(CV)差异无统计学意义($p=0.393$)。群养组的 U_{cat} 比单养组的 U_{cat} 更低,两者差异具有统计学意义($p=0.045$);两组 U_{cat} 的CV差异无统计学意义($p=0.093$),但群养组的 U_{cat} 变异程度比单养组的 U_{cat} 高出约87.5%。群养组FR高于单养组FR,但群养组的SGR和FE均低于单养组的SGR和FE。【结论】群养组的静止代谢较高,在行为和生理上提高了维持耗能的分配;群养组个体间的竞争加强促进了鲤幼鱼运动能力的分化,同时能量底物含量降低可能限制了运动能力。群体效应可能推高机体的能量积累成本。

关键词:竞争;能量代谢;游泳能力;生长性能;鲤鱼

中图分类号:Q178.1⁺¹

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2019)06-0036-05

由于水体具有特殊的理化性质,因而大多数鱼类会与同伴相互协调,使鱼群中的个体各方面特征保持一致,即集群行为^[1-2]。一般认为,鱼类的集群与捕食、繁殖等活动相关^[3],集群可能增强种内竞争,导致个体摄食不均、产生社群等级而压制弱者等效应^[4],从而可能影响个体的生理功能。静止代谢率(Resting metabolic rate, RMR)指鱼类在静止、禁食状态下的能量消耗,反映了鱼类的维持能量消耗和整体生理状况^[5]。研究发现,鱼类集群所致的社群等级导致个体摄食不均,使RMR的个体间差异变大^[6]。游泳是鱼类主要的运动方式,与捕食、逃逸、繁殖等行为密切相关^[7]。匀加速最大游泳速度(Constant acceleration test speed, U_{cat})是指在测试水流均匀加速的条件下,鱼类能够到达的最大游泳速度,主要反映鱼类的无氧游泳运动能力,在捕食和逃逸方面具有重要的生态学意义^[8-9]。近些年来,国际上关于鱼类社群内竞争的研究大多集中在行为学与个性方面^[2],而竞争强度导致鱼类维持代谢、游泳能力、生长性能等生理与功能方面的研究结果却较为少见。

鲤(*Cyprinus carpio*)是中国重要的养殖鱼类品种,生长快速,代谢水平个体差异较大^[10],游泳能力较强^[11]。本研究在25℃条件下,以鲤幼鱼为对象,进行个体与群体喂养,分别测定RMR、 U_{cat} 、特定生长率(SGR)、摄食率(FR)和转化率(FE),旨在研究群体效应对静止代谢、游泳能力及生长性能的影响及其中原因。

1 材料与方法

1.1 实验鱼获取与暂养

鲤幼鱼(体质量5~8 g,样本量 $n=300$)采集自重庆北碚歇马渔场,运回实验室后放置于长×宽×高为180 cm×120 cm×60 cm的循环水池中驯养14 d,驯养水为溶氧量在 $7.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上的新鲜脱氯水,温度为 $(25 \pm 0.5)^\circ\text{C}$,光周期为12 h光照:12 h黑暗。采用通威公司生产的商业饲料浮料(主要成分蛋白质、脂肪、纤维、灰分和水分以质量分数计分别为:35%,3%,10%,12%和10%)每日饱足投喂1次。

1.2 实验设计

暂养结束后,挑选60尾鲤幼鱼测定体质量,并随机分成6组,每组10尾。其中3组进行单养,每尾鱼被放置

* 收稿日期:2019-05-30 修回日期:2019-07-30 网络出版时间:2019-11-25 10:35

资助项目:国家自然科学基金(No. 31702020)

第一作者简介:夏丹阳,女,研究方向为鱼类生理生态学, E-mail:544970036@qq.com;通信作者:庞旭,男,讲师,博士, E-mail:pangxu9@hotmail.com

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20191125.1034.034.html>

在长×宽×高为 9 cm×14 cm×20 cm 的独立养殖单元格中;另外 3 组进行群养,每 10 尾鱼放置在 1 个长×宽×高为 99 cm×44 cm×20 cm 的养殖水槽中。实验期间,每 2 d 更换约 10% 体积的经曝气脱氯的等温水,水温控制在(25±0.5)℃。每日 9:00 和 18:00 分别饱足投喂 1 次,群养组的投喂颗粒数与单养组摄食颗粒数总量相等,喂食 1 h 后收集剩余饲料(在此时间段内饲料均未溶解)并进行摄食量统计,为期 21 d。

1.3 生长性能的测定

喂养期结束后测量体长、体质量,测量精确度为:体长 0.1 cm、体质量 0.1 g,通过以下公式计算各项生长状况参数。

$$V_{FR} = \frac{2F_c}{(W_t + W_0)t} \times 100\%,$$

$$V_{FE} = \frac{W_t - W_0}{F_c} \times 100\%,$$

$$V_{SGR} = \frac{(\ln W_t - \ln W_0)}{t} \times 100\%。$$

其中: V_{FR} 为 FR(单位: d^{-1}), V_{FE} 为 FE, V_{SGR} 为 SGR(单位: d^{-1}); F_c 为鱼所消耗的食物总质量(单位:g), W_0 和 W_t 分别为实验鱼的初始、终末体质量(单位:g), t 为实验周期(单位:d)。

1.4 RMR 的测定

采用流水式呼吸代谢仪测量实验鱼的耗氧率(M_{O_2} ,单位: $mg \cdot h^{-1} \cdot kg^{-1}$)^[12]。实验鱼禁食 24 h 后从养殖水槽取出,测量体质量并放入呼吸代谢仪的呼吸室(规格:直径 3 cm、容积 120 mL)中适应 12 h,采用溶氧仪(HQ_{30d},美国哈希公司)于 9:00—14:00 间每 1 h 测定 1 次 M_{O_2} ,将 6 次测定的 M_{O_2} 取平均值作为实验鱼的 RMR 参数。 M_{O_2} 测量过程中的实验环境如水温、光照、溶氧等与驯化时保持一致,并在每个呼吸室的两侧都覆盖黑色盲板,避免个体间视觉交流引起的轻微活动^[5]。 M_{O_2} 计算公式为:

$$M_{O_2} = \frac{\Delta O_2 \times v}{m}。$$

其中: ΔO_2 代表空白呼吸室与装有实验鱼呼吸室的溶氧量的差值(单位: $mg \cdot L^{-1}$); v 为呼吸室流速(单位: $L \cdot h^{-1}$),通过测量 1 min 内出水口的水流量计算而来,且流速经测量前调整,保证装鱼呼吸室与空白呼吸室的溶氧量差值为 0.5~1 $mg \cdot L^{-1}$,且未造成轻度低氧环境; m 为实验鱼的终末体质量(单位:g)。由于实验鱼体质量相近,本研究未进行单位体质量的耗氧率校正。

1.5 游泳能力的测定

测定 RMR 后,将实验鱼转移至游泳仪适应 1 h,其中的水流速率为 4 $cm \cdot s^{-1}$ 。然后通过计算机设定加速度为 0.167 $cm \cdot s^{-2}$ 的匀加速水流^[13],进行游泳测定。当实验鱼不能离开游泳管后部的蜂窝板达 20 s,视为力竭,而此时的水流速率定义为该实验鱼的 U_{cat} (单位: $cm \cdot s^{-1}$)。

1.6 数据处理与统计分析

用 Excel 2003 进行实验数据的常规计算,结果以“平均值±标准误”表示。用 SPSS 22.0 进行数理统计分析。采用独立样本 t 检验比较单养、群养组间 RMR, U_{cat} ,SGR,FR 和 FE 的差异;采用 u 检验比较组间 RMR 和 U_{cat} 的变异系数(CV)的差异^[14]。当 $p < 0.05$ 时,上述分析的结果具有统计学意义。

2 结果

2.1 RMR 的比较

图 1 显示:21 d 的摄食生长结束后,单养与群养的鲤幼鱼的 RMR 分别为(252.5±9.8)和(293.4±9.7) $mg \cdot h^{-1} \cdot kg^{-1}$,且群养组 RMR 比单养组 RMR 高 16.2%,两者差异具有统计学意义($p=0.006$);两者的变化范围分别为 174.0~402.0 $mg \cdot h^{-1} \cdot kg^{-1}$ 和 171.8~402.4 $mg \cdot h^{-1} \cdot kg^{-1}$;两者的 CV 分别为 21.3% 和 18.1%,无统计学意义上的差异($p=0.393$)。

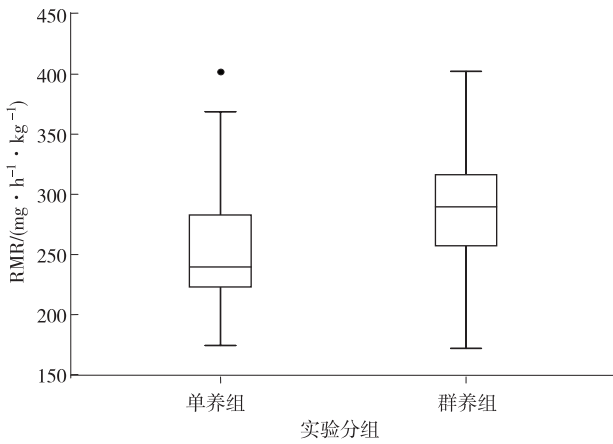
2.2 游泳能力的比较

从图 2 可以看出:21 d 的摄食生长结束后,单养与群养的鲤幼鱼 U_{cat} 分别为(72.7±1.6)和(67.6±2.0) $cm \cdot s^{-1}$,且群养组的 U_{cat} 低于单养组的 U_{cat} ,两者差异具有统计学意义($p=0.045$);两者的变化范围分别为:60~97.5 $cm \cdot s^{-1}$ 和 35~90 $cm \cdot s^{-1}$;两者的 CV 分别为 11.9% 和 16.4%,无统计学意义上的差异($p=$

0.093)。

2.3 生长状况的比较

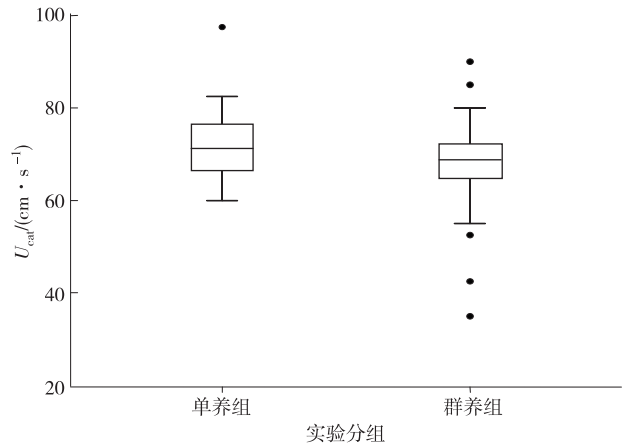
经过 21 d 摄食生长,与单养组的 SGR,FR 和 FE 相比,群养组的 SGR 降低 12.1%,FR 增加 7.9%,FE 降低 16.5%,两组的这 3 个指标间差异均无统计学意义(图 3)。



注:圆点表示可用的离群值,下同。 t 检验结果显示两组的 RMR 差异具有统计学意义($p=0.006$),但它们的 CV 差异无统计学意义($p=0.393$)。

图 1 单养组与群养组的 RMR

Fig. 1 Resting metabolic rate of individual-fed fish and group-fed fish



注: t 检验结果显示两组的 U_{cat} 差异具有统计学意义($p=0.045$),但它们的 CV 差异无统计学意义($p=0.093$)。

图 2 单养组与群养组的 U_{cat}

Fig. 2 Swimming performance of individual-fed fish and group-fed fish

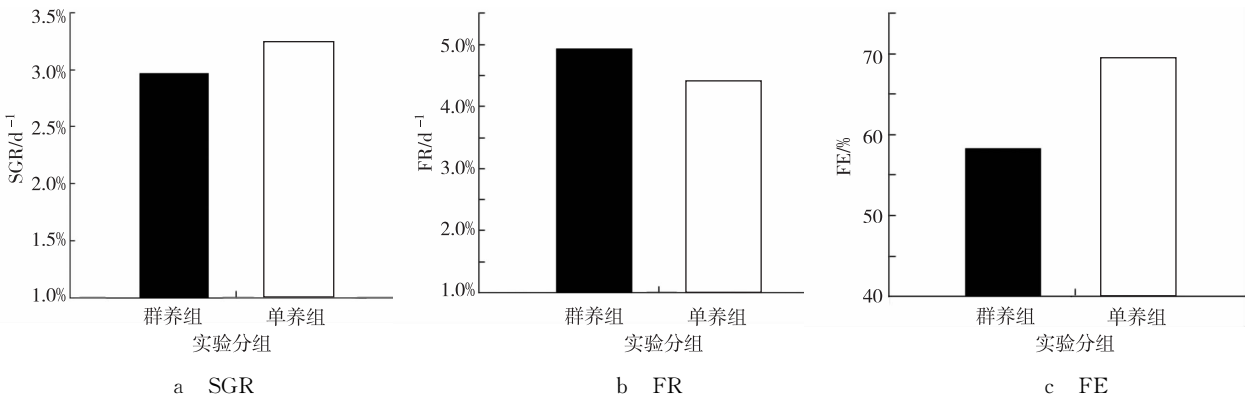


图 3 单养组与群养组的生长状况

Fig. 3 Growth conditions of individual-fed fish and group-fed fish.

3 讨论

3.1 群养对维持耗能的影响

本研究发现,鲤幼鱼的群养组 RMR 高于单养组 RMR,这与有关虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)的研究结果一致^[15],表明群养提高了鱼体的代谢成本。有研究认为,鱼类在群体中自发游泳更多,且需要维持相邻距离^[2],相关的神经活动耗能增多^[15]。此外,由于群体内竞争较强,身体激素水平(如生长激素等)可能升高,也可增高个体的代谢水平^[16]。鱼类 RMR 的个体差异可能与遗传及早期生活史相关^[17]。因物种而异,大西洋鲑(*Salmo salar*)的个体差异达 5 倍^[18],欧鲈(*Dicentrarchus labrax*)的个体差异为 2.0~2.6 倍^[19]。本研究中,鲤幼鱼的 RMR 组内变异接近 4 倍,与前人对鲤鱼的研究结果相近^[10]。本研究中,群养组与单养组间的 CV 值相近,表明群养并未加剧维持耗能的个体间分化。

3.2 群养对游泳能力的影响

种内竞争可加速性状特征的分化,是演化的重要动力之一^[20]。本研究发现,群养组与单养组的 U_{cat} 个体差异分别约为 3 倍和 1.6 倍,可见群养组的 U_{cat} 比单养组的 U_{cat} 高出约 87.5%,表明群养个体的游泳能力分化更

大,其中原因可能在于:群内竞争导致个体获取的食物量不均,即使是饱足投喂,优势个体仍可能垄断食物资源^[2],而摄食和生长的差异可能导致游泳能力的差异^[21]。然而,群养组的 U_{cat} 低于单养组的 U_{cat} ,则表明群养降低了鲤幼鱼游泳能力。 U_{cat} 需要肌肉的诸多能量底物如糖类、三酰甘油、游离脂肪酸等的参与^[22-24],若这些能量底物含量降低,则可能限制游泳能力。不过,群养是否影响能量底物含量,还需要深入研究。

3.3 单养与群养对生长性能的影响

本研究中,和单养组相比,群养组的FR增加7.9%,FE降低16.5%,SGR降低12.1%,但两组这些指标的差异并无统计学意义。通常情况下,当食物资源充足时,高RMR个体的消化能力较强^[25],摄食较高^[26],生长较快^[25]。生长是有机体能量积累的过程,快速生长是很多生物重要的适应性特征^[27]。然而在本研究中,群养组摄食率和代谢水平较高,但生长率却较低,表明群养组的实验鱼尽管摄食增多,但由于维持耗能也增加,分配到生长的能量反而减少,这提示群体效应可能推高机体的能量积累成本。

参考文献:

- [1] SHAW E. Schooling fishes[J]. American Scientist, 1978, 66(2):166-175.
- [2] FU S J. Effects of group size on schooling behavior in two cyprinid fish species[J]. Aquatic Biology, 2016, 25: 165-172.
- [3] COTEABC J, SIH A. Individual sociability and choosiness between shoal types [J]. Animal Behaviour, 2012, 83(6): 1469-1476.
- [4] WARD A, WEBSTER M, HART P, et al. Intraspecific food competition in fishes [J]. Fish and Fisheries, 2010, 7(4): 231-261.
- [5] ZENG L Q, FU C, FU S J. The effects of temperature and food availability on growth, flexibility in metabolic rates and their relationships in juvenile common carp [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A, 2018, 217: 26-34.
- [6] van LEEUWEN T E, ROSENFELD J S, RICHARDS J G. Effects of food ration on SMR; influence of food consumption on individual variation in metabolic rate in juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) [J]. Journal of Animal Ecology, 2012, 81(2): 395-402.
- [7] PLAUT I. Critical swimming speed; its ecological relevance [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A, 2001, 131(1): 41-50.
- [8] REIDY S P, KERR S R, NELSON J A. Aerobic and anaerobic swimming performance of individual atlantic cod [J]. Journal of Experimental Biology, 2000, 203(2): 347-357.
- [9] PANG X, FU S J, LI X M, et al. The effects of starvation and re-feeding on growth and swimming performance of juvenile black carp (*Mylopharyngodon piceus*) [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2016, 42(4): 1203-1212.
- [10] 张曦, 曾令清, 付世建, 等. 鲤幼鱼标准代谢率的个体差异与运动性能和摄食代谢的关系 [J]. 动物学杂志, 2016, 51(3): 384-394.
- [11] ZHANG X, ZENG L Q, FU S J, et al. Intraspecific differences in standard metabolic rate and its correlations with locomotion and feeding metabolism in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. Chinese Journal of Zoology, 2016, 51(3): 384-394.
- [12] 张缓缓, 曾燊. 6种快速游泳鲤科鱼类的形态差异及功能适应 [J]. 天津农业科学, 2015, 21(3): 71-75.
- [13] ZHANG H H, ZENG Y. Morphological differences and functional adaptation about 6 kinds of fast swimming cyprinid fish [J]. Tianjin Agricultural Sciences, 2015, 21(3): 71-75.
- [14] 付世建, 曹振东, 彭姜岚. 追赶和空气曝露时间对瓦氏黄颡鱼耗氧率的影响 [J]. 动物学杂志, 2007, 42(2): 111-115.
- [15] FU S J, CAO Z D, PENG J L. The effects of chasing and air exposing on oxygen consumption in *Pelteobag vachelli* [J]. Chinese Journal of Zoology, 2007, 42(2): 111-115.
- [16] PANG X, YUAN X Z, CAO Z D, et al. The effect of temperature on repeat swimming performance in juvenile qingbo (*Spinibarbus sinensis*) [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2015, 41(1): 1-11.
- [17] 程琮, 刘一志, 王如德. 变异系数的显著性检验 [J]. 泰山医学院学报, 2009, 30(12): 897-899.
- [18] CHENG C, LIU Y Z, WANG R D. Significance test for coefficients of variation [J]. Journal of Taishan Medical College, 2009, 30(12): 897-899.
- [19] LI H W, BROCKSEN R W. Approaches to the analysis of energetic costs of intraspecific competition for space by rainbow trout (*Salmo gairdneri*) [J]. Journal of Fish Biology, 2010, 11(4): 329-341.
- [20] HERBERT N A, ARMSTRONG J D, BJORNSSON B T. Evidence that growth hormone-induced elevation in routine metabolism of juvenile Atlantic salmon is a result of increased spontaneous activity [J]. Journal of Fish Biology, 2001, 59(3): 754-757.
- [21] BURTON T, KILLEN S S, ARMSTRONG J D, et al. What causes intraspecific variation in resting metabolic rate and what are its ecological consequences? [J]. Proceedings of the Royal Society B, 2011, 278(1724): 3465-

3473.

- [18] REID D, ARMSTRONG J D, METCALFE N B. Estimated standard metabolic rate interacts with territory quality and density to determine the growth rates of juvenile Atlantic salmon[J]. *Functional Ecology*, 2011, 25(6):1360-1367.
- [19] KILLEN S S, MARRAS S, MCKENZIE D J. Fuel, fasting, fear: routine metabolic rate and food deprivation exert synergistic effects on risk-taking in individual juvenile european sea bass[J]. *Journal of Animal Ecology*, 2011, 80(5):1024-1033.
- [20] BOLNICK D I, AMARASEKARE P, ARAUJO M S, et al. Why intraspecific trait variation matters in community ecology[J]. *Trends in Ecology and Evolution*, 2011, 26(4): 183-192.
- [21] BILLERBECK J M, LANKFORD E T, CONOVER D O. Evolution of intrinsic growth and energy acquisition Rates. I. trade-offs with swimming performance in *Menidia menidia* [J]. *Evolution*, 2001, 55(9):1863-1872.
- [22] PEAKE S J. Gait transition speed as an alternate measure of maximum aerobic capacity in fishes[J]. *Journal of Fish Biology*, 2008, 72(9):645-655.
- [23] 汤洪芬, 曹振东, 付世建. 饥饿过程鲑鱼幼鱼静代谢、身体组成及与力竭性运动后过量耗氧的关系[J]. *水生生物学报*, 2010, 34(1):190-195.
- TANG H F, CAO Z D, FU S J. The relationship among resting metabolic rate, body composition and excess post-excess oxygen consumption during fasting in *silurus asotus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, 34(1):190-195.
- [24] ZHAO W W, PANG X, PENG J L, et al. The effects of hypoxia acclimation, exercise training and fasting on swimming performance in juvenile qingbo (*Spinibarbus sinensis*) [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2012, 38(5):1367-1377.
- [25] ALLEN D, ROSENFELD J S, RICHARDS J G. Physiological basis of metabolic trade-offs between growth and performance among different strains of rainbow trout[J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2016, 73(10):1493-1506.
- [26] AUER S K, SALIN K, RUDOLF A M, et al. Flexibility in metabolic rate confers a growth advantage under changing food availability[J]. *Journal of Animal Ecology*, 2015, 84(5):1405-1411.
- [27] WERNER E E, MITTELBACH G G. Experimental tests of optimal habitat use in fish: the role of relative habitat profitability[J]. *Ecology*, 1983, 64(6):1525-1539.

Animal Sciences

Resting Metabolism, Swimming Ability and Growth Performance of Juvenile *Cyprinus carpio* in Individual-Fed and Group-Fed Conditions

XIA Danyang, SHEN Cong, LI Qian, ZHU Xiaoling, LUO Yiping, PANG Xu
(Key Laboratory of Freshwater Fish Reproduction and Development, Ministry of Education,
School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: [Purposes] Here it aimed to test the differences of maintenance energy consumption, swimming ability and growth performance of juvenile *Cyprinus carpio* under the individual-fed and the group-fed conditions. [Methods] Juvenile common carp were randomly divided into 'individual' and 'group' and fed for 21 days at 25 °C. Then resting metabolic rate (RMR) and the maximum constant acceleration test speed (U_{cat}) of each fish were determined and the special growth rate (SGR), feeding rate (FR), and the conversion rate (FE) of each group of fish were calculated. [Findings] The results showed that the RMR was significantly lower in the individual-fed fish than that of group-fed fish ($p=0.006$), and the difference of variable coefficient (CV) was not significant ($p=0.393$) between individual-fed fish and group-fed fish. The group-fed fish was significantly lower than that of the individual-fed fish ($p=0.045$), and the difference of CV was not significant ($p=0.093$), but the individual variation of U_{cat} in the group-fed fish is higher than of the individual-fed fish at 87.5%. FR was higher, while SGR and FE were lower in the group-fed fish than in the individual-fed fish. [Conclusions] The results showed that group-fed fish has a higher resting metabolism, suggesting an improved energy distribution for maintenance in behavior and physiology. The competition among organisms promotes the differentiation in the athletic ability of juvenile *C. carpio*, and the reduction of energy substrate content may limit athletic ability. Group effects may drive up the cost of energy accumulation in organisms.

Keywords: competition; energy metabolism; swimming ability; growth performance; *Cyprinus carpio*

低剂量镉对雌性斑马鱼卵子发生的影响*

谢冬梅, 曾 征, 易循娥, 李英文, 陈启亮

(重庆师范大学 生命科学学院 重庆市高校动物生物学重点实验室, 重庆 401331)

摘要:【目的】考察低剂量镉(Cd)暴露对斑马鱼(*Danio rerio*)雌性卵子发生的影响。【方法】将成年雌性斑马鱼分为两组, 分别于不添加 Cd²⁺ (对照组)和 Cd²⁺ 质量浓度为 5 μg·L⁻¹ (实验组)的水体中处理 30 d, 而后取实验鱼卵巢进行组织学分析, 并检测雌二醇(E2)的含量以及下丘脑-垂体-性腺(HPG)轴和减数分裂中相关基因的表达量。【结果】1) 与对照组相比, 实验组的卵巢中早期卵母细胞减少而成熟期卵母细胞增多; 2) 实验组血浆中 E2 含量与对照组相比有明显下降, 且两者差异具有统计学意义($p < 0.05$); 3) 与对照组相比, 实验组 HPG 轴中 *gnrh2*, *gnrh3*, *fshβ*, *lhβ*, *fshr* 及 *lhr* 基因的表达上调, 但 *cyp19a1b* 和 *cyp19a1a* 基因的表达下调; 4) 实验组与对照组相比, 卵巢中减数分裂标记基因 *dmcl* 及减数分裂起始相关基因 *aldh1a2* 的表达量均具有统计学意义上的上升($p < 0.05$)。【结论】研究所设置的 Cd 暴露条件能干扰成年雌性斑马鱼卵子发生过程关键调控基因的表达, 并影响性激素水平及卵母细胞的正常发育。

关键词: 低剂量镉; 雌性斑马鱼; 卵巢; 雌二醇; 卵子发生

中图分类号: Q175

文献标志码: A

文章编号: 1672-6693(2019)06-0041-06

镉(Cd)是一种难降解且具有高毒性的重金属, 对生物体有广泛而复杂的危害^[1], 是生态环境保护重点防控的环境污染物之一。由于人们在生产和使用颜料、电池、杀虫剂等活动后将含 Cd 的工业和生活废料、废水排入环境水体中, 因而使之遭受不同程度的 Cd 污染, 并威胁到鱼类的生存和生长^[1]。水体中的 Cd 主要通过鱼类的呼吸、进食及体表渗透进入鱼体中^[2]。因 Cd 在生物体内的半衰期长达 10~30 a 且排出速率极低^[3], 所以 Cd 容易在生物体内富集。鱼体内富集的 Cd 可与高分子有机化合物的羟基、氨基等侧基形成复合物来抑制酶的活性, 进而影响细胞的正常功能, 对鱼类的生长发育和生殖带来不利影响^[4-7]。

鱼类的生殖主要受到下丘脑-垂体-性腺(HPG)轴的调控^[8]。下丘脑分泌的促性腺激素释放激素(GnRH)促进脑下垂体前叶分泌促卵泡激素(FSH)和促黄体生成素(LH)这两种重要的促性腺激素(GTH)^[9]。在鱼类生殖调控过程中, FSH 和 LH 通过血液循环到达性腺, 并与之特异性受体结合, 从而调控性腺发育和配子发生^[10]。这些激素作为 HPG 轴的关键信息因子与其他因子一起共同参与调控鱼类的发育和生殖^[9]。此外, 减数分裂是鱼类配子形成和遗传信息稳定传递的重要机制^[11]。目前虽已有大量关于 Cd 暴露损害鱼类生殖功能的研究报道, 但有关低剂量 Cd 暴露对鱼类 HPG 轴及减数分裂关键基因表达的影响研究较为缺乏。

斑马鱼(*Danio rerio*)是毒理学研究的模式生物, 可用于一般毒性测试和毒性机制研究^[12]。本研究将成年雌性斑马鱼分为两组, 一组为不添加 Cd²⁺ 的对照组, 另一组为 Cd²⁺ 暴露质量浓度为 5 μg·L⁻¹ 的实验组。在 Cd 暴露 30 d 后, 解剖实验鱼取卵巢进行组织病理观察, 并检测雌二醇(E2)的含量以及 HPG 轴调控基因(*gnrh2*, *gnrh3*, *fshβ*, *lhβ*, *cyp19a1b*, *fshr*, *lhr* 和 *cyp19a1a*)和减数分裂相关基因(*dmcl*, *sycp3*, *aldh1a2* 和 *cyp26b1*)的表达量, 以初步揭示低剂量 Cd 暴露对鱼类生殖功能的潜在负面影响。

1 材料与方法

1.1 实验鱼的来源与饲养

从国家斑马鱼资源中心(武汉)购得野生型成年雌性斑马鱼(约 120 d 龄), 于室内养殖系统中暂养 14 d, 每日

* 收稿日期: 2019-04-23 修回日期: 2019-08-29 网络出版时间: 2019-11-25 10:35

资助项目: 国家自然科学基金(No. 31901183)

第一作者简介: 谢冬梅, 女, 研究方向为水生毒理学, E-mail: xiedongmei0211@163.com; 通信作者: 陈启亮, 男, 副教授, 博士, E-mail: qlchen@cqnu.edu.cn

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20191125.1034.040.html>

定时投喂商业饲料 3 次。养殖用水为曝气后的自来水,水温为 28 ℃ 左右,溶解氧质量浓度大于 6.0 mg · L⁻¹,光照周期为 14 h 光照:10 h 黑暗。

1.2 实验处理与采样

随机选取发育良好、体质量相近(约 0.57 g)的斑马鱼置入 6 个规格为 50 cm × 20 cm × 30 cm 且盛有 20 L 水的玻璃缸中,每缸 20 尾。然后以中国渔业水质标准中 Cd 质量浓度小于或等于 5 μg · L⁻¹ 为依据,向其中 3 个缸中加入 CdCl₂ 溶液,使水体中 Cd²⁺ 质量浓度为 5 μg · L⁻¹,作为实验组;另外 3 个缸中不加 CdCl₂ 溶液,作为对照组。每日更换缸内 1/2 体积的水并向实验组的缸中补充适量的 CdCl₂ 溶液使其中 Cd 质量浓度保持在 5 μg · L⁻¹。暴露期间斑马鱼的饲养条件同暂养期间一致。Cd 暴露时间为 30 d。

暴露处理结束后,用 MS-222 对所有鱼进行麻醉。从每缸随机选 3 尾鱼,解剖后取卵巢放入波恩氏液中固定,用于组织学分析;从每缸另取 3 尾鱼,置于冰上快速取出脑和卵巢并分别放入含有 1 mL RNAliso Plus (TaKaRa) 的离心管中,用液氮速冻并于 -80 ℃ 保存,用于分析基因的表达水平;将每缸剩下的鱼断尾取血,血液置于含有肝素钠的离心管中,1 000 r · min⁻¹,4 ℃ 离心 10 min,并取上清液于 -80 ℃ 保存以用于 E2 含量测定。

1.3 组织学分析

实验鱼的卵巢样品在波恩氏液中固定 24 h 后,用不同体积分数梯度(70%,80%,90%和 100%)的乙醇进行脱水,然后用石蜡进行包埋。将包埋材料于切片机上切片,切片厚度为 5 μm。然后用苏木精-伊红(HE)染色,最后用中性树胶封片。将对照组和实验组的切片各 9 张(每个切片对应 1 尾实验鱼)在光学显微镜(UB203I,徕卡仪器有限公司)下观察拍照,并统计卵巢中各时期的卵母细胞数量。

1.4 E2 含量测定

将实验鱼血浆样本解冻后,采用 Cayman 公司的酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒测定样本的 E2 含量,操作步骤严格按试剂盒说明书进行。

1.5 实时荧光定量 PCR

依照 RNAliso Plus 试剂盒操作指南分别提取实验鱼脑和卵巢的总 RNA。总 RNA 的完整性通过琼脂糖凝胶电泳检测,总 RNA 的浓度及 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值用微量分光光度计(Nanodrop ND-2000)测定。以提取的总 RNA 为模板,采用 PrimeScript[®] RT 试剂盒(TaKaRa)将之反转录成 cDNA。取 1 μL cDNA(稀释 10 倍)在 CFX96 实时定量 PCR 仪(Bio-Rad)上使用 SYBR Premix Ex Taq[™] 试剂盒(TaKaRa)进行实时荧光定量 PCR 分析,反应总体积为 10 μL,其中包含 1 μL cDNA、0.4 μL 正向/反向引物、3.2 μL 双蒸水和 5 μL SYBR Premix Ex Taq[™],扩增条件为:95 ℃ 预变性 30 s,40 个循环的 95 ℃ 变性 5 s、60 ℃ 退火 30 s 和 72 ℃ 延伸 30 s。基因的相对表达量参照 Livak 等人^[13]的方法计算,所有基因引物序列详见表 1,选择 *eflα* 作为内参基因。

1.6 统计分析

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用独立样本 *t* 检验分析对照组和实验组的数据差异是否在 $p < 0.05$ 水平上具有统计学意义。

2 结果

2.1 卵巢组织学

与对照组(封二彩图 1a)相比,在实验组卵巢中未发现明显的组织学病变,但初级生长期(PG)卵母细胞分布减少,而成熟期(FG)卵母细胞分布增多(封二彩图 1b)。进一步统计后发现,与对照组相比,实验组卵巢中的 PG 细胞减少,卵黄发生中期(MV)和 FG 细胞增多,且上述差异均具有统计学意义($p < 0.05$)(封二彩图 1c)。

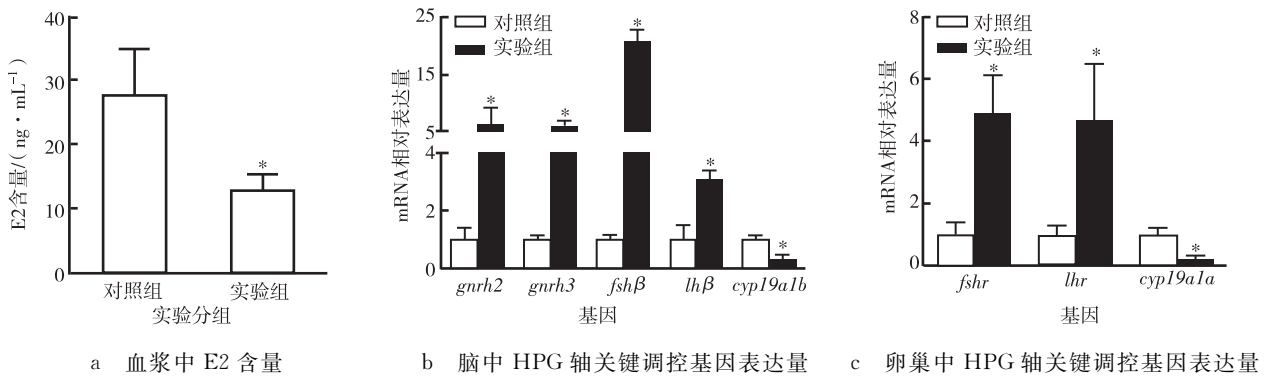
2.2 E2 含量和 HPG 轴关键调控基因表达量

与对照组相比,实验组 E2 含量呈统计学意义上的减少($p < 0.05$)(图 2a)。较对照组而言,实验组脑组织中 *gnrh2*, *gnrh3*, *fshβ* 及 *lhβ* 基因的表达量均有所升高,但 *cyp19a1b* 基因的表达量则有所降低,以上差异均具有统计学意义($p < 0.05$)(图 2b)。此外,与对照组相比,实验组卵巢中 *fshr* 和 *lhr* 基因的表达量均明显升高,而 *cyp19a1a* 基因的表达量则明显降低,且上述差异均具有统计学意义($p < 0.05$)(图 2c)。

表 1 qPCR 引物序列

Tab.1 Primers used for qPCR

基因	引物序列	Genbank 序列号	文献来源
<i>gnrh2</i>	F: 5'-GGTCTCACGGCTGGTATCCT-3' R: 5'-TGCCTCGCAGAGCTTCACT-3'	NM181439	文献[14]
<i>gnrh3</i>	F: 5'-TGGTCCAGTTGTTGCTGTTAGTT-3' R: 5'-CCTGAATGTTGCCTCCATTTTC-3'	NM182887	文献[14]
<i>fshβ</i>	F: 5'-TGAGCGCAGAATCAGAATG-3' R: 5'-AGGCTGTGGTGTGCGATTGT-3'	AY424303	文献[15]
<i>lhβ</i>	F: 5'-GGACACGCAGAGACACTT-3' R: 5'-CACCGATACCGTCTCATTT-3'	AY424304	文献[15]
<i>cyp19a1b</i>	F: 5'-ACTAAGCAAGTCTCCGCTGTGTACC-3' R: 5'-TTTAAACATACCGATGCATTGCAGACC-3'	AF183908	文献[15]
<i>fshr</i>	F: 5'-ATGGATCCACTCGCTCTTT-3' R: 5'-GCATTACTGGGAATCCTCTCTAT-3'	AY278107	文献[15]
<i>lhr</i>	F: 5'-AAGGACGAGTCGCTGAAAC-3' R: 5'-GATTCATTGTGGCGTATTCA-3'	AY714133	文献[15]
<i>cyp19a1a</i>	F: 5'-CTGGGCCACACATCGAGAG-3' R: 5'-CTGAAAGGGCTCAGGACAA-3'	AF226620	文献[16]
<i>aldh1a2</i>	F: 5'-TGGTCGATGGTGTCTGATG-3' R: 5'-CCAGGTTAGCAAGGTAAGCA-3'	NM131850	文献[17]
<i>cyp26b1</i>	F: 5'-TGTCAGGAGGATACAGAATAGC-3' R: 5'-AGCCGAGGTGTCATGGGT-3'	NM212666	文献[17]
<i>sycp3</i>	F: 5'-GCGTTTGTGTTGTTGGATT-3' R: 5'-CACCGTCAGTATGTTTGG-3'	NM001040350	文献[17]
<i>dmcl</i>	F: 5'-GAGGCTGAAGGACATCG-3' R: 5'-TCCAGCCGTAATGGCAA-3'	NM001020782	文献[17]
<i>ef1a</i>	F: 5'-GATCACTGGTACTTCTCAGGCTGA-3' R: 5'-GGTGAAAGCCAGGAGGGC-3'	FJ915061	文献[9]

图 2 Cd²⁺ 暴露改变成年雌性斑马鱼 E2 含量和 HPG 轴中关键调控基因表达量Fig. 2 Cd²⁺ exposure changes the content of E2 and the expression level of key regulation genes in HPG-axis in adult female zebrafish

2.3 卵巢中减数分裂标记基因和起始相关基因表达量

与对照组相比,实验组卵巢中减数分裂标记基因 *dmcl* 和减数分裂起始相关基因 *aldh1a2* 的表达量均呈统计学意义上的上调($p < 0.05$)(图 3)。但对照组和实验组卵巢中标记基因 *sycp3* 和起始相关基因 *cyp26b1* 的表达量无统计学意义上的差异。

3 讨论

鱼类的配子发生是一个复杂的生理过程,是鱼类生存和生殖的必要保障,受到多种因素的调控。HPG 轴是

调控鱼类生殖的重要机制轴,参与调控性激素合成、性腺发育、配子发生、性别分化等过程^[18-19]。在 HPG 轴调控系统中,下丘脑分泌 GnRH 作用于垂体,促进后者释放 FSH 和 LH,这两种激素则进一步作用于性腺,促进性腺的发育和成熟^[9]。此外,胆固醇经一系列调节转化生成性类固醇也是该系统的关键组分。

HPG 轴中调控类固醇合成的相关基因对环境污染物较为敏感^[20]。在本研究中,与对照组相比,Cd²⁺暴露导致斑马鱼脑中 *gnrh2*, *gnrh3*, *fsh β* 和 *lh β* 基因以及卵巢中 *fshr* 和 *lhr* 基因表达有所上调,其中 *gnrh2* 和 *gnrh3* 基因表达的上调可能引起 GnRH 含量增加,进而促进 FSH 和 LH 的合成和分泌。在雌鱼中,FSH 和 LH 与卵巢中相应受体结合,分别起到调节卵子发生和促进卵母细胞的成熟及排卵的作用^[21]。

上述基因表达量的提高可能导致相应蛋白合成分泌增多进而促进卵子发生和卵母细胞成熟过程,从而引起卵巢组织学中成熟期卵母细胞数量增加。E2 是雌鱼中调控生殖功能的重要类固醇激素,可刺激脑垂体 GTH 的分泌细胞发育并进入分泌活动,从而促进卵巢发育^[22]。HPG 轴中 *gnrh2*, *gnrh3*, *fsh β* 和 *lh β* 基因表达量上调可能会使 GnRH 和 GTH 合成增多,进而促进 E2 的合成,最终导致体内 E2 水平上升。Luo 等人^[23]的研究表明,雌性罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)暴露于 50, 100 和 200 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Cd²⁺ 中 30 d 后,血浆中 E2 水平明显升高。然而本研究结果显示,与对照组相比,实验组 E2 含量明显下降,这似乎与 *gnrh2*, *gnrh3*, *fsh β* 和 *lh β* 基因表达量上调的结果相矛盾。推测可能的原因有以下两方面:一方面,Cd²⁺暴露可能通过影响 E2 合成的关键酶——芳香化酶(CYP19)的活性而导致 E2 含量下降;另一方面,HPG 轴中这些基因表达量的上调可能是由 Cd²⁺暴露引起 E2 水平下降的负反馈调节机制所导致。为了验证上述推测,本研究进一步检测了编码 CYP19 基因的表达量。CYP19 可催化睾酮转化为 E2,在大多数硬骨鱼中已经发现了两种不同表达模式的 CYP19 编码基因,即 *cyp19a1a* 和 *cyp19a1b*;前者主要在卵巢中表达,而后者主要在脑中表达^[24]。在本研究中,与对照组相比,Cd²⁺暴露明显下调了斑马鱼脑中 *cyp19a1b* 和卵巢中 *cyp19a1a* 的表达量,这可能使得 CYP19 的合成减少,从而影响睾酮向 E2 的转化,最终导致了血浆中 E2 含量下降。

减数分裂是鱼类卵巢发育和配子发生的必然生理活动,鱼类的生殖与生殖细胞的减数分裂密切相关^[25]。在减数分裂过程中,视黄酸(RA)是硬骨鱼类减数分裂起始所必需的物质^[26],它的含量受到 RA 降解酶(Cyp26)和 RA 合成酶(Aldh1a)的共同调控^[26-27]。本研究发现,与对照组相比,Cd²⁺暴露使斑马鱼卵巢中编码 Aldh1a 合成的基因 *aldh1a2* 表达量有明显升高,而编码 Cyp26 合成的基因 *cyp26b1* 的表达量虽然有升高的趋势但对对照组的这一基因表达量相比,差异不具有统计学意义。这一结果表明,实验组的斑马鱼 RA 的合成可能加强,进而增强卵母细胞减数分裂起始过程。另外,联会复合体蛋白 3(SYCP3)和 DNA 减数分裂重组酶 1(DMC1)分别在减数分裂中同源染色体联会和重组过程中发挥重要作用^[28-29]。*sycp3* 和 *dmc1* 是减数分裂前期的分子标记基因,并特异表达于生殖细胞中^[30-31]。在本研究中,与对照组相比,Cd²⁺暴露导致斑马鱼卵巢中 *dmc1* 基因的表达量明显上调,且 *sycp3* 基因的表达量也轻微上升,这暗示着斑马鱼卵母细胞减数分裂加强,从而呈现出早期卵母细胞数量较少而成熟期卵母细胞增多的组织学变化。当然,早期卵母细胞数量减少也有可能由 Cd²⁺暴露引起卵母细胞凋亡有关。

综上所述,本研究结果表明 5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Cd²⁺暴露 30 d 能干扰成年雌性斑马鱼 HPG 轴和减数分裂相关基因的表达,并影响性激素水平及卵母细胞的正常发育,进而可能对该鱼的生殖构成潜在威胁。

参考文献:

[1] LU X F, LIU F Y, ZHOU X P, et al. Effects of cadmium, 17 beta-estradiol and their interaction in the male Chinese loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) [J]. Chinese Science Bulletin, 2012, 57(8): 858-863.

[2] HUO J F, DONG A, NIU X, et al. Effects of cadmium on oxidative stress activities in plasma of freshwater turtle *Chinemys reevesii* [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2018, 25(8): 8027-8034.

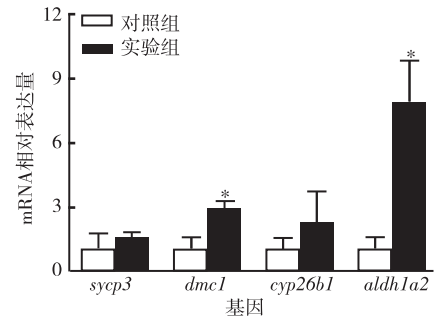


图 3 Cd²⁺暴露改变成年雌性斑马鱼卵巢中减数分裂标记基因和起始相关基因表达量

Fig. 3 Cd²⁺ exposure changes the expression level of meiosis marker and initial related genes in ovary of adult female zebrafish

- [3] JÄRUP L, BERGLUND M, ELINDER C G, et al. Health effects of cadmium exposure; a review of the literature and a risk estimate[J]. *Scandinavian Journal of Work Environment & Health*, 1998, 24(suppl 1): 1-52.
- [4] METWALLY A, FINKEMEIER I, GEORGI M, et al. Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedlings [J]. *Plant Physiology*, 2003, 132(1): 272-281.
- [5] 谢冬梅, 龚仕玲, 李英文, 等. 镉诱导斑马鱼肝脏的组织学损伤和氧化应激[J]. *重庆师范大学学报(自然科学版)*, 2018, 35(4): 31-36.
- XIE D M, GONG S L, LI Y W, et al. Cadmium induces histological damage and oxidative stress in the liver of zebrafish [J]. *Journal of Chongqing Normal University (Natural Science)*, 2018, 35(4): 31-36.
- [6] KIM S G, EOM K H, KIM S S, et al. Kinetics of Cd accumulation and elimination in tissues of juvenile rockfish (*Sebastes schlegeli*) exposed to dietary Cd[J]. *Marine Environmental Research*, 2006, 62(5): 327-340.
- [7] DRIESSNACK M K, JAMWAL A, NIYOGI S. Effects of chronic waterborne cadmium and zinc interactions on tissue-specific metal accumulation and reproduction in fathead minnow (*Pimephales promelas*) [J]. *Ecotoxicology & Environmental Safety*, 2017, 140: 65-75.
- [8] MA Y B, HAN J, GUO Y Y, et al. Disruption of endocrine function in *in vitro* H295R cell-based and in *in vivo* assay in zebrafish by 2,4-dichlorophenol[J]. *Aquatic Toxicology*, 2012, 106: 173-181.
- [9] ZHANG Q F, LI Y W, LIU Z H, et al. Reproductive toxicity of inorganic mercury exposure in adult zebrafish: histological damage, oxidative stress, and alterations of sex hormone and gene expression in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis[J]. *Aquatic Toxicology*, 2016, 177: 417-424.
- [10] PALERMO R. Differential actions of FSH and LH during folliculogenesis[J]. *Reproductive Biomedicine Online*, 2007, 15(3): 326-337.
- [11] YAMASHITA M. Molecular mechanisms of meiotic maturation and arrest in fish and amphibian oocytes[J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 1998, 9(5): 569-579.
- [12] 王佳佳, 徐超, 屠云杰, 等. 斑马鱼及其胚胎在毒理学中的实验研究与应用进展[J]. *生态毒理学报*, 2007, 2(2): 123-135.
- WANG J J, XU C, TU Y J, et al. Experimental research and application of zebrafish and embryos in toxicology[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2007, 2(2): 123-135.
- [13] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [14] LIANG Y Q, HUANG G Y, LIU S S, et al. Long-term exposure to environmentally relevant concentrations of progesterone and norgestrel affects sex differentiation in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2015, 160: 172-179.
- [15] HOU J, LI L, WU N, et al. Reproduction impairment and endocrine disruption in female zebrafish after long-term exposure to MC-LR; a life cycle assessment[J]. *Environmental Pollution*, 2016, 208: 477-485.
- [16] HOFFMANN J L, ORIS J T. Altered gene expression: a mechanism for reproductive toxicity in zebrafish exposed to benzo [a] pyrene [J]. *Aquatic Toxicology*, 2006, 78: 332-340.
- [17] 安晶晶, 谢冬梅, 李英文, 等. 低剂量镉暴露对雄性斑马鱼生殖内分泌的干扰[J]. *重庆师范大学学报(自然科学版)*, 2019, 36(2): 24-29.
- AN J J, XIE D M, LI Y W, et al. The interference of low dose of cadmium exposure on the reproductive endocrine of male zebrafish [J]. *Journal of Chongqing Normal University (Natural Science)*, 2019, 36(2): 24-29.
- [18] ACHERMANN J C, JAMESON J L. Fertility and infertility: genetic contributions from the hypothalamic-pituitary-gonadal axis [J]. *Molecular Endocrinology*, 1999, 13(6): 812-818.
- [19] HACHFI L, COUVRAY S, SIMIDE R, et al. Impact of endocrine disrupting chemicals (EDCs) on hypothalamic-pituitary-gonad-liver (HPGL) axis in fish [J]. *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 2012, 4(1): 14-30.
- [20] SU Y J, LI L, HOU J, et al. Life-cycle exposure to microcystin-LR interferes with the reproductive endocrine system of male zebrafish [J]. *Aquatic Toxicology*, 2016, 175: 205-212.
- [21] MOLES G, CARRILLO M, MAÑANÓS E, et al. Temporal profile of brain and pituitary GnRHs, GnRH-R and gonadotropin mRNA expression and content during early development in European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) [J]. *General & Comparative Endocrinology*, 2007, 150(1): 75-86.
- [22] 方永强, 张为民, 翁幼竹. 17β 雌二醇促进鲮鱼性腺发育的作用机制: 雌激素受体的定位 [J]. *应用海洋学学报*, 2003, 22(4): 422-425.
- FANG Y Q, ZHANG W M, WENG Y Z. Action mechanisms of estradiol- 17β to promote gonadal development of grey mullet; localization of estrogen receptors [J]. *Journal of Applied Oceanography*, 2003, 22(4): 422-425.
- [23] LUO Y J, SHAN D, ZHONG H, et al. Subchronic effects of cadmium on the gonads, expressions of steroid hormones and sex-related genes in tilapia *Oreochromis niloticus* [J]. *Ecotoxicology*, 2015, 24(10): 2213-2223.
- [24] CHIANG E F, YAN Y L, TONG S K, et al. Characteriza-

- tion of duplicated zebrafish *cyp19* genes [J]. Journal of Experimental Zoology, 2001, 290(7): 709-714.
- [25] 刘燕明. 减数分裂与有性生殖[J]. 生物学通报, 1995, 30(11): 15-17.
- LIU Y M. Meiosis and sexual reproduction [J]. Biological Bulletin, 1995, 30(11): 15-17.
- [26] FENG R, FANG L, CHENG Y, et al. Retinoic acid homeostasis through *aldh1a2* and *cyp26a1* mediates meiotic entry in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Scientific Reports, 2015, 5: 10131.
- [27] 王雅琴, 王德寿, 李英文, 等. 环境剂量的多种环境雌激素长期暴露阻断斑马鱼成鱼精子发生 [J]. 重庆师范大学学报(自然科学版), 2018, 35(1): 23-30.
- WANG Y Q, WANG D S, LI Y W, et al. Long-term exposure to internal relevant levels of environmental estrogens induced arrested spermatogenesis in zebrafish adults [J]. Journal of Chongqing Normal University (Natural Science), 2018, 35(1): 23-30.
- [28] TSUI S, DAI T, ROETTGER S, et al. Identification of two novel proteins that interact with germ-cell-specific RNA-binding proteins DAZ and DAZL1 [J]. Genomics, 2000, 65(3): 266-273.
- [29] BISHOP D K, PARK D, XU L, et al. DMC1: a meiosis-specific yeast homolog of *E. coli* *recA* required for recombination, synaptonemal complex formation, and cell cycle progression [J]. Cell, 1992, 69(3): 439-456.
- [30] KAJIURAKOBAYASHI H, KOBAYASHI T, NAGAHAMA Y. Cloning of cDNAs and the differential expression of A-type cyclins and Dmc1 during spermatogenesis in the Japanese eel, a teleost fish [J]. Developmental Dynamics, 2005, 232(4): 1115-1123.
- [31] LAU E L, LEE M F, CHANG C F. Conserved sex-specific timing of meiotic initiation during sex differentiation in the protandrous black porgy *Acanthopagrus schlegelii* [J]. Biology of Reproduction, 2013, 88(6): 150-164.

Animal Sciences

Effect of Low Dose of Cadmium on Oogenesis of Female Zebrafish

XIE Dongmei, ZENG Zheng, YI Xune, LI Yingwen, CHEN Qiliang

(Chongqing Key Laboratory of Animal Biology, College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract: [Purposes] To investigate the effect of low dose cadmium (Cd) exposure on oogenesis of female zebrafish (*Danio rerio*). [Methods] Fish were divided into two groups and exposed to water with Cd²⁺ concentration of 0 (the control group) and 5 μg · L⁻¹ (the test group), respectively. After 30 days, ovaries were taken for histological analysis, and the level of estradiol (E2) as well as expressions of genes related hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis and meiosis were detected. [Findings] Compared with the control group: 1) decreased early oocytes and increased mature oocytes in zebrafish ovaries were observed in the test group; 2) the content of E2 in plasma decreased significantly ($p < 0.05$); 3) expressions of *gnrh2*, *gnrh3*, *fshβ*, *lhβ*, *fshr*, and *lhr* in HPG axis were up-regulated, while expressions of *cyp19a1b* and *cyp19a1a* were down-regulated; 4) the expression levels of meiosis marker and initial related genes (*dmcl* and *aldh1a2*) in ovary were significantly increased ($p < 0.05$). [Conclusions] The Cd exposure condition set by the study could interfere the expression of key regulation genes involved in oogenesis in adult female zebrafish, and affect sex hormone levels and normal development of the ovary.

Keywords: low dose cadmium; female zebrafish; ovary; estradiol; oogenesis

(责任编辑 方 兴)