

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20171110002

叶梦婷, 傅诗雨, 岑绮雯, 等. 胚胎期草甘膦铵盐暴露对中华鳖幼体的表型与生理表现的影响[J]. 生态毒理学报, 2018, 13(5): 190-199

Ye M T, Fu S Y, Cen Q W, et al. Effects of glyphosate-ammonium exposure on hatchling phenotypes and physiological performances in the Chinese soft-shelled turtle during the embryonic stage [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2018, 13(5): 190-199 (in Chinese)

胚胎期草甘膦铵盐暴露对中华鳖幼体的表型与生理表现的影响

叶梦婷, 傅诗雨, 岑绮雯, 吴琼, 胡英超, 陆洪良*

杭州师范大学生命与环境科学学院生态系统保护与恢复杭州市重点实验室, 杭州 310036

收稿日期: 2017-11-10 录用日期: 2018-01-09

摘要: 草甘膦是全球范围内生产与使用量最大的除草剂。虽然草甘膦制剂被分于低毒等级, 但是许多研究显示其对动物的生理、行为表达具有广泛的干扰作用。本研究将中华鳖胚胎暴露于不同浓度的草甘膦铵盐溶液以评估草甘膦除草剂对其胚胎发育及孵出幼体表型及生理表现的影响。结果显示: 一定浓度范围($5 \sim 5\,000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)内, 草甘膦铵盐对中华鳖胚胎发育速率、孵出幼体大小、游泳能力、肝脏甘油三酯含量、超氧化物歧化酶活性、丙二醛含量以及热激蛋白 70 mRNA 相对表达量无显著影响。结果表明: 一定浓度范围草甘膦除草剂暴露对中华鳖胚胎发育的影响较小, 不改变孵出幼体的表型及其生理表现。

关键词: 草甘膦; 中华鳖; 超氧化物歧化酶活性; 丙二醛含量; 热激蛋白 70 表达水平

文章编号: 1673-5897(2018)5-190-10 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Effects of Glyphosate-ammonium Exposure on Hatchling Phenotypes and Physiological Performances in the Chinese Soft-shelled Turtle during the Embryonic Stage

Ye Mengting, Fu Shiyu, Cen Qiwen, Wu Qiong, Hu Yingchao, Lu Hongliang*

Key Laboratory of Hangzhou City for Ecosystem Protection and Restoration, School of Life and Environmental Sciences, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, China

Received 10 November 2017 accepted 9 January 2018

Abstract: Many studies have shown that glyphosate and its commercial formulations have widespread effects on the physiological and behavioral performances of animals, despite being classified as low-level toxicity. In aquatic vertebrates, toxicity evaluation of glyphosate mainly focuses on fish and amphibians; however, knowledge of detrimental effects in reptiles is very limited. Here, we exposed eggs of Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*) to five different concentration treatments ($0, 5, 50, 500$ and $5\,000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) of glyphosate-ammonium and measured the locomotor performance, activity level, and some hepatic physiological indicators (triglyceride level, superoxide dismutase activity, malonaldehyde content, and relative mRNA expression of heat shock protein 70) of hatchlings to assess potential impacts of embryonic exposure to glyphosate herbicide on embryonic development and hatchling

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(LY15C030006)

作者简介: 叶梦婷(1997—), 女, 学士, 研究方向为生态毒理学, E-mail: 995171074@qq.com;

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: honglianglu@outlook.com

phenotypes and physiological performances in this species. Within the range of 5-5 000 mg·L⁻¹, glyphosate-ammonium exposure did not affect the hatching success and incubation period of *P. sinensis* eggs. Except for activity level, other examined hatchling traits could not be affected by glyphosate-ammonium exposure, possibly due to the low toxicity of glyphosate.

Keywords: glyphosate-ammonium; *Pelodiscus sinensis*; superoxide dismutase; malonaldehyde; heat shock protein 70 expression

草甘膦,英文名 glyphosate,学名 N-(膦酰基甲基)甘氨酸,商品名农达(Roundup),分子式 C₃H₈NO₃P,是全球范围内最为普遍使用的一种广谱性有机磷除草剂,其通过茎叶吸收进入植物体内,抑制氨基酸的生物合成,干扰光合作用,从而使有害杂草枯死^[1]。草甘膦纯品为白色固体,水溶性差,实际生产中通常制成易溶于水的草甘膦铵盐。草甘膦是全球生产应用最大的除草剂,约占全球除草剂总用量的 30%。虽然我国转基因农作物种植少,草甘膦国内需求量较小,但我国是草甘膦最大生产国,产量占全球 80% 以上^[2]。虽然草甘膦在自然水体中降解快速,但部分残留物及其降解产物容易被水底沉积物吸附。据报道,在美国一些河流中草甘膦残留浓度达到 2.2 mg·L⁻¹^[3];而我国太湖水体中被检出的草甘膦含量最高可达 15 mg·L⁻¹^[4]。

草甘膦的安全性仍存在争议,美国环保署等在内的多个研究机构将其毒性分在低毒等级^[5]。低剂量草甘膦处理甚至会显示出刺激生长效应^[6]。在草甘膦制剂生产实践中,为提高其除草效率常添加表面活性剂作为助力剂,应用中的草甘膦制剂的毒性主要源自于表面活性剂。草甘膦制剂的急性毒性效应在不同动物类群中存在较大差异^[7-11]。例如,一些蛙类蝌蚪和鱼类 24 h 或 48 h 的半数致死浓度(median lethal concentration, LC₅₀)为 2.4 ~ 18.1 mg·L⁻¹^[8-10];克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)幼体 48 h 的 LC₅₀值则为 4.06×10³ mg·L⁻¹^[11]。草甘膦与其他农药、重金属等污染物具交互作用而显示联合毒性^[12-13]。许多研究表明草甘膦是一种典型的环境内分泌干扰化合物(endocrine disrupting chemical)^[14-15]。草甘膦制剂被认为具有抗雄激素活性(antiandrogenic activity),可竞争结合雄激素受体(androgen receptor),诱导改变雄激素受体蛋白表达,引起雌激素水平增加而导致个体雌性化^[16];草甘膦制剂还可能具有肥胖效应,长期给老鼠注射低剂量草甘膦制剂可能会引起肝脏脂类的积累而导致脂肪肝^[17]。此外,在针对鱼类的测试中发现,一定剂量的草甘膦处理

会引起鱼类生理代谢方面的改变。例如,草甘膦制剂处理导致银鱼(*Rhamdia quelen*)肝脏中葡萄糖含量的减少,脑中乙酰胆碱脂酶活性降低,但肌肉中葡萄糖、脂质过氧化物等含量增加,肝脏和肌肉乳酸增加等一系列的反应^[18]。金鱼(*Carassius auratus*)在不同浓度的草甘膦制剂中静态暴露后,肝脏羟基信号强度和丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量增加,但超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性降低;而动态暴露后肝脏羟基信号增加,MDA 含量随时间先增加后降低^[19]。

草甘膦对水生动物毒理的研究主要集中于鱼类、两栖类动物^[7-9,18-21],很少有涉及水生或半水生爬行动物(龟鳖类和鳄类)。龟鳖类爬行动物是一个特化类群,许多种类存活时间很长。它们生活于含有农药残留的水体环境时,残留物可能在其体内不断累积,因而对其造成长期的毒害^[22]。仅有的几例研究显示:草甘膦制剂能够影响红耳滑龟(*Trachemys scripta elegans*)胚胎发育,虽然在较低浓度处理下孵出个体变化不明显,但高浓度下孵出个体较小^[23];其他一些杀虫剂(例如氯丹、反式九氯、二氯二苯三氯乙烷)可能改变红耳滑龟孵出幼体的大小和性别^[24]。中华鳖野外分布很广,在我国、日本、越南、韩国等都能见到。中华鳖具有较大的食用及药用价值,我国各地已广泛养殖,是最重要的水产经济动物种类之一。中华鳖通常养在紧邻农田的池塘中,在农田施用的农药残留物可能随水流进入这些养殖池塘。然而,农药施用对养殖中华鳖毒理效应以及相关安全风险评价未见有报道。本文用不同浓度的草甘膦铵盐处理孵化过程中的中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)卵以检测草甘膦制剂对其胚胎发育、孵出幼体形态、运动及生理表现的影响。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 溶液配制与中华鳖卵收集

实验用除草剂为浙江新安化工集团股份有限公司生产的草甘膦铵盐(C₃H₁₁N₂O₃P),草甘膦含量为 68%(固体样本送上海微谱化工技术服务有限公司

检测,用液相色谱质谱分析实测含量为 68% ~ 70%)。称取 1 g 草甘膦铵盐放入烧杯中,加入 135 mL 蒸馏水后搅拌,配制成浓度为 $5\,000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的草甘膦盐溶液。然后,取已制备的 $5\,000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 草甘膦铵盐溶液加入蒸馏水分别稀释 10、100 和 1 000 倍,以配制成 500 、 50 和 $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的草甘膦铵盐溶液。将不同浓度的草甘膦铵盐溶液转移至棕色瓶中,然后放置在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷藏箱中保存备用。

实验用 200 枚已受精的中华鳖(具受精白斑的卵被认为是受精卵)卵购自杭州市余杭区某龟鳖养殖场。所有卵均于产出当天收集,随后运至实验室。每一枚卵用 Mitutoyo 数显游标卡尺(型号: CD-15AXWW, 日本川崎市, Mitutoyo Corporation)测定卵径(精确到 0.01 mm);用 Mettler-Toledo 电子天平(型号: PB303-N, 中国上海, Mettler-Toledo 仪器(上海)有限公司)称重(精确到 0.001 g)、用 HB 中华铅笔在卵表面编上序号。然后,将卵随机均等地分配到 5 个不同草甘膦铵盐浓度处理组(对照组 0、5、50、500 和 $5\,000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)处理(每组 40 枚卵,同窝卵分配于不同处理)。卵半埋于内含潮湿基质(-220 kPa , 按重量干蛭石:水 = 1:1 混合)的孵化盒中,卵白斑朝上。所有孵化盒均放置温度预先设置为 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的人工气候室内,每 3 日对孵化盒称重并补充基质散失的水分以保持基质湿度恒定。

1.2 中华鳖卵处理

用点光源确定中华鳖卵胚胎位置,并用无毒记号笔画上记号。每天上午 10:00—12:00,用移液枪吸取 $100\text{ }\mu\text{L}$ 相应浓度的草甘膦铵盐溶液,小心涂抹于每个中华鳖卵的胚胎位置上方表面(浓度为 $0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的对照组则吸取 $100\text{ }\mu\text{L}$ 蒸馏水涂抹于中华鳖卵表面)^[23]。处理同时检查鳖卵的发霉情况,及时清除表面霉菌斑点或移除霉变的卵。

1.3 幼体大小与运动表现

待有少量幼体破壳,每组中随机取 5 枚未破壳的卵解剖取幼体肝脏用于相应生理指标检测外,其余卵正常孵化。孵化时间记为养殖场卵产出至幼体破壳的间隔天数,孵化率用每一处理中幼体破壳个数占入孵卵数(不计入用于解剖的 5 枚卵)的比例表示。检查孵出幼体畸形情况,用 Mettler-Toledo 电子天平测量其体重,用 Mitutoyo 数显游标卡尺测量其背甲长和背甲宽。待腹部卵黄完全吸收后,在 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 体温条件下测定幼体运动(游泳)表现和活动水平。实验前 1 小时将幼体放置在温度预先设定为 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$

的 FPQ 型人工气候箱(型号: PQX-330AY-12H, 中国宁波, 宁波莱福科技有限公司)内以控制其体温,然后放入含有 10 cm 水高(水温预先控制在 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$)的直形水槽($120\text{ cm}\times 15\text{ cm}\times 20\text{ cm}$)的一端,一人用笔刷驱赶,另一人用 Panasonic 数码摄像机(型号: HDC-HS900, 日本大阪, Panasonic corporation)记录幼鳖在跑道中一个游泳来回的运动表现,视频片段用 MGI Video Wave III 软件(MGI Software Co., Canada)读出,游泳速度用幼体游过 20 cm 的最大速度表示。活动水平在 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的恒温室中进行测定,每一处理组随机选取 10 只幼体,单独放置于敞口的圆筒盒内,盒内水温约 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。用数码摄像机在下午 12:00—16:00 录制 4 h 视频,视频片段用 MGI Video Wave III 软件读出,活动水平用视频录制期间幼体有活动的时间比例表示。

1.4 后期胚胎肝脏生理指标

每组中随机取出孵化后期的 5 枚卵(透过卵壳观察卵内幼体背甲已着色),小心打开卵壳取出幼体并解剖将其肝脏分离,用电子天平称取肝脏重量,旋即放入 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中保存。取小部分肝脏组织并称重,加入 $400\text{ }\mu\text{L}$ 甲醇,组织打碎, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱放置 24 h, 然后加入 $800\text{ }\mu\text{L}$ 氯仿和 $200\text{ }\mu\text{L}$ dH_2O , 震荡、离心,分别取上层和下层清液转移至棕色小瓶中,均放于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

购买南京建成生物工程研究所生产的甘油三酯(TG)试剂盒、考马斯亮蓝试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒和丙二醛(MDA)试剂盒。取保存的肝脏组织下清液,按甘油三酯试剂盒说明书要求测定肝脏甘油三酯含量;取上清液,按考马斯亮蓝试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒和丙二醛(MDA)试剂盒说明书要求分别测定肝脏总蛋白质含量、SOD 活力和 MDA 含量。

1.5 肝脏热激蛋白 70 基因表达

总 RNA 提取试剂盒、mRNA 纯化试剂盒和 cDNA 文库构建试剂盒购自 Invitrogen 公司。取上述保存的部分肝脏组织,采用 Trizol 试剂抽取总 RNA,取少量提取液进行琼脂糖凝胶电泳,紫外线检测 RNA 纯度及浓度。提取的总 RNA 放置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱保存。用 mRNA 纯化试剂盒纯化 mRNA,用 cDNA 文库构建试剂盒将纯化后 mRNA 反转录成 cDNA,然后中华鳖肝脏的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,获得中华鳖热激蛋白 70(Hsp70)基因序列。用于扩增的引物基于 GenBank 已收录的中华鳖 HSP70 基因序列

(基因序列号: JN582024)设计获得, F1: 5'-CATATGATATCGCCACCATGTCCGGCAAAGCGCCT-3', R1: 5'-CTCGAGATATCGTCGACTTCTTCAATGGT-TGGT-3' (划线部分为限制性内切酶 Sma I 酶切位点)。PCR 反应体系为: 无菌水 16.9 μL , 10 $\times$ 缓冲液 2.5 μL , 模板 cDNA 1 μL , dNTPs 4 μL , 引物和 Taq DNA 聚合酶各 0.2 μL ; 反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min 预变性模板 DNA, 然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 5 个循环后调整为 94 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 68 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 25 个循环后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。将扩增产物进行电泳, 并送去公司测序, 获得序列在 ncbi 的 blast 和 Expert Protein Analysis System 进行分析结构域分析。扩增获得的基因序列确认正确后, 以 SYBR Green 为荧光指示剂进行实时荧光定量 PCR。反应体系为: 无菌水 8 μL , 模板 DNA 1 μL , 购买自大连宝生物工程有限公司 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II 荧光定量试剂盒 10 μL , 引物各 0.5 μL , 反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 、3 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 、10 s, 40 个循环, 59 $^{\circ}\text{C}$ 、10 s, 然后 72 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 每个反应重复 3 次。该反应以 β -actin 基因为内参基因, 扩增引物分别为: 5'-TGTTACCCATACTGTGCCCATC-3' 和 5'-TAGCCATCTCCTGTTCAAAATCC-3'。扩增结果对照溶解曲线, 分析数据。

1.6 数据处理

用 Statistica 6.0 软件包进行统计分析。对数据进行参数统计分析前, 分别检验其正态性(Kolmogorov-Smirnov 检验)和方差同质性(Bartlett 检验)。用单因子方差分析检测草甘膦铵盐处理对中华鳖卵孵化期、孵出幼体游泳速度、活动水平及肝脏生理指标的影响; 以卵重为协变量的单因子协方差分析检测草甘膦铵盐处理对孵出幼体大小(体重、背甲长和背甲宽)的影响。文中涉及的非参数统计为 G 检验。

描述性统计值用平均值 $\pm$ 标准误表示, 显著性水平设置为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果 (Results)

2.1 不同浓度草甘膦除草剂对中华鳖胚胎发育的影响

入孵的中华鳖卵均为受精卵, 在孵化过程中可见的受精白斑在卵表面逐渐增大至整枚卵完全变白。不同组孵入的卵大小无显著的差异(卵重: $F_{4\ 195} = 0.25$, $P = 0.909$; 卵直径: $F_{4\ 195} = 0.70$, $P = 0.606$) (表 1)。线性回归分析显示孵化时间与入孵卵重无显著相关性($r = 0.04$, $F_{1\ 147} = 0.30$, $P = 0.588$)。不同草甘膦除草剂浓度处理对中华鳖卵孵化时间的影响不显著($F_{4\ 144} = 2.00$, $P = 0.103$, 表 1)。500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组的卵孵化成功率略低, 但在统计上 5 个浓度处理下的孵化成功率差异不显著($G = 4.88$, $df = 4$, $P = 0.300$, 表 1)。

2.2 不同浓度草甘膦除草剂对中华鳖幼体大小和活动水平的影响

以卵重为协变量的协方差分析显示: 不同草甘膦除草剂浓度处理对中华鳖孵出幼体的大小无显著影响(体重: $F_{4\ 143} = 0.27$, $P = 0.896$; 背甲长: $F_{4\ 143} = 1.31$, $P = 0.268$; 背甲宽: $F_{4\ 143} = 1.28$, $P = 0.281$) (图 1)。游泳测试中, 小部分个体不游动或仅有少量游动, 相应个体数据未用于后续统计分析。不同草甘膦除草剂浓度处理对中华鳖孵出幼体的游泳速度无显著影响($F_{4\ 138} = 0.72$, $P = 0.578$, 图 2)。但是, 从每组中随机选取 10 只中华鳖幼体的活动水平存在显著的组间差异($F_{4\ 45} = 3.14$, $P = 0.023$)。活动水平随着草甘膦除草剂浓度增加出现先上升后下降的趋势(图 2)。对照组个体 80% 的时间表现活跃, 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组的活动时间达到最大(93%), 但是 5 000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组又下降到对照组水平(77%)。

表 1 不同草甘膦除草剂浓度处理下中华鳖入孵卵大小、孵化率及孵化时间
Table 1 Egg size, hatching success and incubation period of *Pelodiscus sinensis* under different concentration treatments of glyphosate-ammonium

处理浓度/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	初始卵重/g	卵径/mm	孵化率/%	孵化时间/d
Treatment concentration/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Initial egg mass/g	Egg diameter/mm	Hatching success/%	Incubation period/d
0	5.10 $\pm$ 0.06	20.57 $\pm$ 0.10	82.9 (29/35)	53.97 $\pm$ 0.21
5	5.04 $\pm$ 0.06	20.50 $\pm$ 0.09	88.6 (31/35)	53.97 $\pm$ 0.20
50	5.05 $\pm$ 0.08	20.58 $\pm$ 0.13	91.4 (32/35)	53.63 $\pm$ 0.19
500	5.03 $\pm$ 0.06	20.75 $\pm$ 0.09	74.3 (26/35)	53.54 $\pm$ 0.21
5 000	5.01 $\pm$ 0.09	20.64 $\pm$ 0.15	88.6 (31/35)	54.32 $\pm$ 0.28

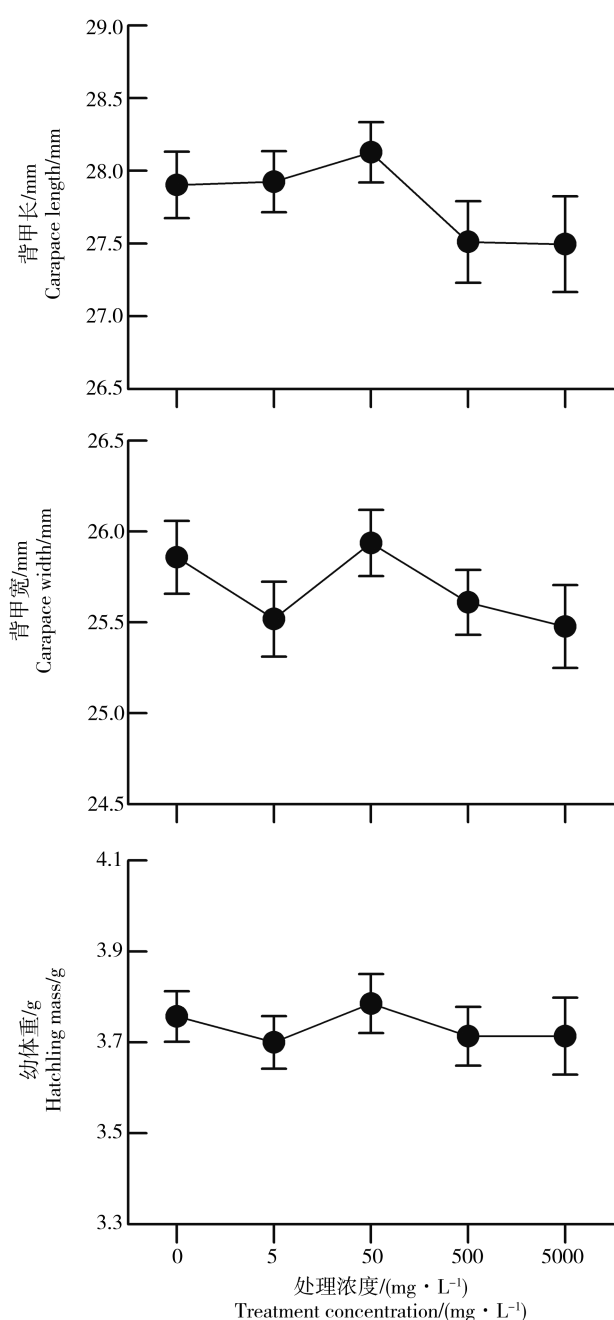


图1 不同处理组孵出中华鳖幼体的大小

Fig. 1 The size of *Pelodiscus sinensis* hatchlings from different concentration treatments of glyphosate-ammonium

2.3 不同浓度草甘膦除草剂对中华鳖幼体肝脏甘油三酯含量、超氧化物歧化酶活性、丙二醛含量的影响

解剖获得的中华鳖破壳前幼体的肝脏中,甘油三酯含量、超氧化物歧化酶活性以及丙二醛含量均无显著的组间差异(TG: $F_{4,16} = 1.16$, $P = 0.363$; SOD: $F_{4,16} = 2.67$, $P = 0.094$; MDA: $F_{4,16} = 1.75$, $P = 0.188$)(图3)。

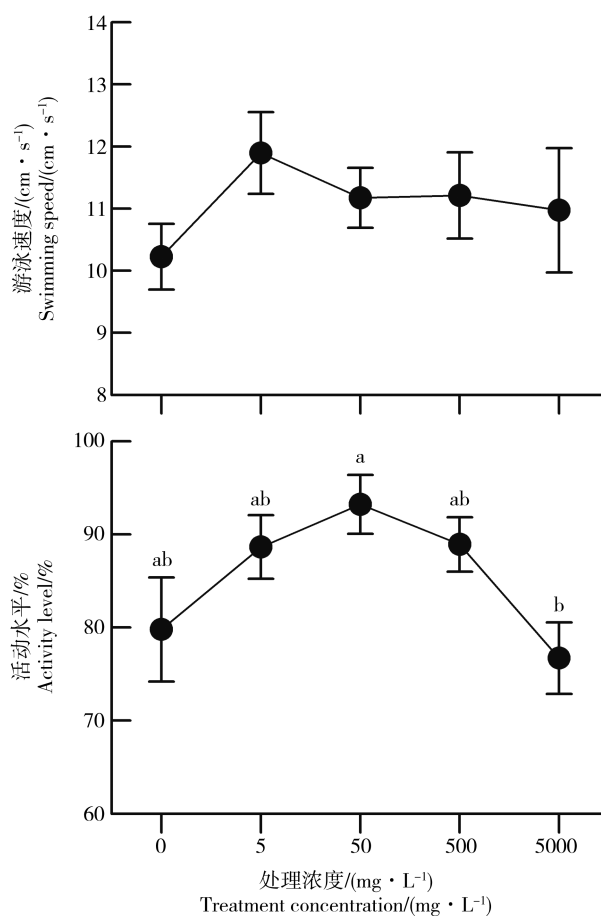


图2 不同处理组孵出中华鳖幼体的游泳速度和活动水平

注:不同字母表示平均值差异显著,Tukey's test, $a > b$ 。

Fig. 2 Swimming performance and activity level of *Pelodiscus sinensis* hatchlings from different concentration treatments of glyphosate-ammonium

Note: Means with different superscripts in the lower graph are statistically different. Tukey's test, $a > b$.

2.4 不同浓度草甘膦除草剂对中华鳖幼体肝脏Hsp70 基因表达的影响

草甘膦除草剂处理有导致破壳前幼体肝脏中热激蛋白70 表达水平上调的趋势,但是热激蛋白70 mRNA 相对表达量无显著的组间差异($F_{4,10} = 1.30$, $P = 0.332$)(图4)。

3 讨论(Discussion)

动物胚胎发育期是最脆弱的阶段,该时期的农药暴露可能影响其存活以及产出后幼体的生长发育。不同草甘膦除草剂浓度处理组的中华鳖卵孵化率差异并不大。相似的研究的结果也见于其他龟鳖类动物。例如,一定浓度范围的草甘膦制剂处理(68 ~ 1 501 mg · L⁻¹)对红耳滑龟卵的孵化成功率的影响

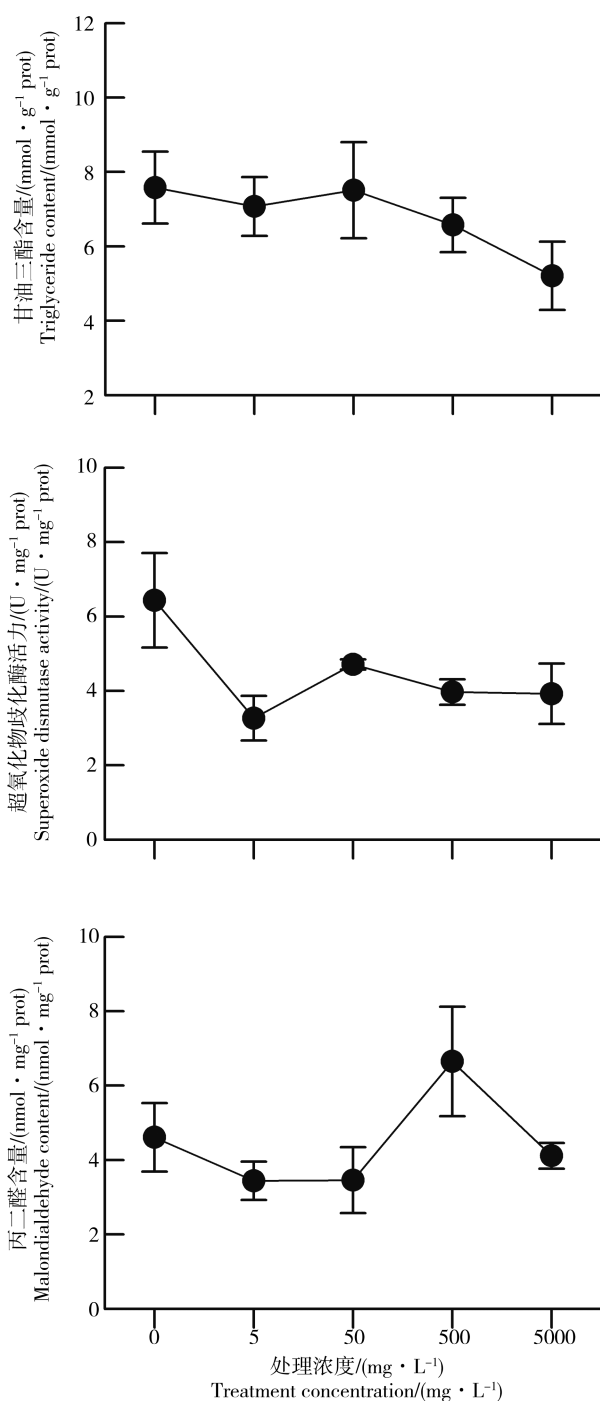


图3 不同浓度处理中华鳖幼体肝脏甘油三脂含量、超氧化物歧化酶活性及丙二醛含量

Fig. 3 Triglyceride level, superoxide dismutase activity and malonaldehyde content in the livers of *Pelodiscus sinensis* hatchlings from different concentration treatments of glyphosate-ammonium

不大(80%~100%),仅11 206 mg·L⁻¹浓度处理下孵化成功率较低(73%)^[23]。已有的一些研究显示包括除草剂、杀虫剂在内的农药对龟鳖和鳄类动物卵孵化的影响并不总展现明显的致死效应。例如,在一

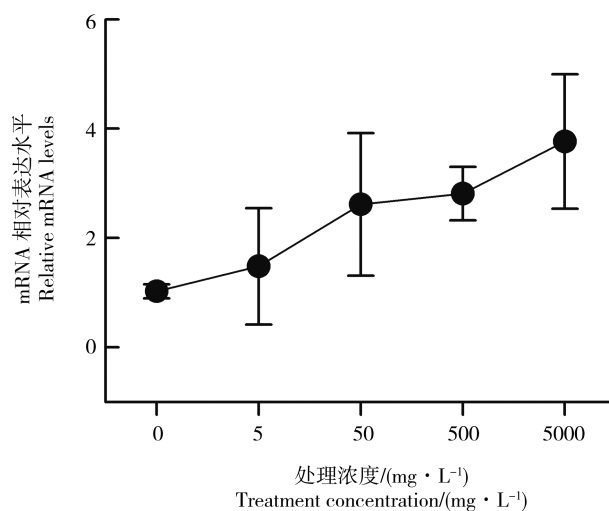


图4 不同处理组中华鳖后期胚胎肝脏中Hsp70 mRNA的表达情况

Fig. 4 Relative mRNA expression of heat shock protein 70 in the livers of *Pelodiscus sinensis* hatchlings from different concentration treatments of glyphosate-ammonium

定剂量范围内,二氯二苯三氯乙烷暴露并不影响绿海龟(*Chelonia mydas*)和红耳滑龟的卵孵化成功率^[24-25];同样,杀虫剂毒杀芬(toxaphene)和溴氰菊酯(deltamethrin)暴露不影响美洲短吻鳄(*Alligator mississippiensis*)、红耳滑龟和乌龟(*Chinemys reevesii*)卵孵化率^[26-27];异丙甲草胺等除草剂暴露也并没有引起北美拟鳄龟(*Chelydra serpentina*)卵孵化率的显著下降^[28]。然而,在鱼类及两栖类动物的胚胎测试中,农药暴露常使其胚胎致畸或致死^[29-30]。除不同有机农药的毒性差异、动物胚胎大小类群间差异所产生农药暴露胚胎致死效应差异外,农药残余物从环境中转至卵内累积的效率差别也可能是一个重要方面。卵壳特征(例如蛋壳结构与通透性)和卵孵化时周边基质性能的差异会使农药残余物迁移效率存在差别,从而使不同动物类群在农药暴露时出现不同的胚胎致死效应^[31]。龟鳖和鳄类动物卵外面具有较坚硬的壳,而鱼类和两栖类动物卵外面仅有高通透性的膜,所以有机磷农药分子更容易透过鱼类和两栖类动物外层卵膜并在卵内累积而使其胚胎致畸致死^[31]。

胚胎期低剂量农药暴露并不一定直接引起畸形或死亡,但可能会长期地影响孵出幼体的表现。不同浓度处理组孵出的中华鳖幼体大小和游泳能力无显著差异,这与已有报道的其他农药处理卵生爬行动物的结果有差异。例如,草甘膦、毒杀芬和硫丹处理会分别使红耳滑龟、美洲短吻鳄和宽吻凯门鳄

(*Caiman latirostris*) 孵出幼体减小^[23,26,32]。较高浓度农药处理可能会引起胚胎能量消耗增加,从而导致孵出幼体偏小^[23-24]。然而,草甘膦处理并不影响幼体肝脏甘油三酯含量,可能部分地反映草甘膦除草剂处理后中华鳖胚胎能量消耗变化不大,而不会改变孵出幼体的大小。卵生动物胚胎期农药暴露对其胚后生长的影响可能是长期的。由于本研究未测定中华鳖孵出幼体后期的生长情况,因而无法确定胚胎期草甘膦暴露的有害效应是否会在后期出现。有意思的是,孵出幼体的活动水平随草甘膦除草剂浓度的增加先上升后下降。可能说明:较低浓度的草甘膦除草剂暴露促进孵出幼体增加觅食时间以获取较多食物来使其生长快速,较高浓度暴露则使幼体降低觅食活动,而导致其生长缓慢。

草甘膦已被认定属于环境内分泌干扰物,人或动物胚胎期的暴露可能会引起机体内分泌失衡而造成生长发育异常^[16]。与其他有机磷农药相似,草甘膦具有抗雄性激素活性,会干扰类固醇合成而阻断性别决定途径,使性器官形成发生逆转,将雄性个体转变成雌性个体^[26,33]。例如,多氯联苯(polychlorinated biphenyls)、水体中残留的二氯二苯三氯乙烷使红耳滑龟、佛罗里达红腹龟(*Chrysemys nelsoni*)、美洲短吻鳄等种类雄性胚胎雌性化^[33-36]。由于新生幼鳖的性别难以鉴定、生长缓慢,本研究并没有性别方面数据,草甘膦是否会改变中华鳖的性别决定有待于进一步确定。

随着草甘膦除草剂浓度的增加,中华鳖幼体肝脏甘油三酯含量有略微下降,但差异不显著。具抗雄性激素活性化合物暴露导致肝脏甘油三酯含量下降在其他动物种类中有发现。例如,给雄性老鼠投喂氟他胺(flutamide)会导致其肝脏甘油三酯含量显著下降^[37]。然而,在其他研究中发现抗雄性激素活性化合物暴露会降低脂肪水解酶的活性,或者具有雌激素化合物类似效应(增加体内雌激素含量或提高雌激素/雄激素比例)而导致肝脏脂肪积累,进而使甘油三酯含量上升^[38-39]。最近的一项针对老鼠的研究显示草甘膦暴露会导致其肝脏脂肪积累^[17],因此这种抗雄性激素活性化合物的肥胖效应在不同物种是否存在差异仍需更多的数据来支持。SOD 是机体抗氧化、清除自由基的主要酶类;MDA 是脂质过氧化的终产物之一,其含量高低可间接反映机体细胞受自由基攻击的程度。中华鳖幼体肝脏 SOD 活性随草甘膦除草剂浓度增加无显著变化,这与一

些其他物种的研究结果不一致。鱼类、两栖类动物中草甘膦暴露通常会导致肝脏 SOD 活性上升^[40-41];仅在少数研究中显示相反的趋势^[19,42]。草甘膦暴露可能会诱发机体脂质氧化反应,因而导致肝脏 MDA 含量上升^[19]。本研究中华草甘膦暴露对中华鳖肝脏 MDA 含量的影响并不大。

Hsp70 蛋白在生物体受到环境胁迫时会大量表达,是反映环境污染程度的有效生物学标志物。Hsp70 蛋白在动物表现环境耐受能力时起到很保守的作用,其应对外源性物质暴露的表达是机体出现的保护性反应。不同浓度草甘膦除草剂处理组的中华鳖幼体肝脏 Hsp70 相对表达量在统计上差异不显著。但是,随着草甘膦除草剂浓度的增加,Hsp70 表达水平呈现上调的趋势,这种反应可能有助于减少草甘膦对发育过程中胚胎的伤害。草甘膦暴露导致 Hsp70 表达上调的结果也见于其他物种(例如,秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans*)^[43]。然而,不同环境内分泌干扰化合物暴露产生热激蛋白表达趋势并不一致。壬基酚(4-nonylphenol)和辛基酚(4-t-octylphenol)暴露导致潮间带桡足动物(*Tigriopus japonicus*)Hsp70 表达下调,但双酚 A(bisphenol A)暴露会导致其表达上调^[44]。

在不同浓度的草甘膦除草剂处理下,绝大多数检测的中华鳖幼体表型与生理指标无显著的组间差异。经一段时间降解,土壤中草甘膦的残留量并不高(例如,农田施用草甘膦 21 d 后,可检测到的残留量为 $0.008 \sim 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)^[45]。虽然自然环境条件下孵化的中华鳖卵表面均会接触土壤,但土壤草甘膦残留量远低于本研究的测试浓度,因此可以推测自然环境中中华鳖胚胎发育受土壤残留草甘膦的毒害作用应很小。结果也表明:胚胎期草甘膦除草剂暴露对中华鳖的胚胎发育、孵出幼体的影响小于鱼类、两栖类等其他水生动物,亦小于柔性壳卵的红耳滑龟。这种差异可能来自于不同动物类群卵构造上的差别。与鱼类、两栖类动物卵外层高通透性的膜相比,龟鳖类动物卵厚实的外壳能更好地抵御污染物的进入。本文初步分析不同草甘膦除草剂浓度处理对中华鳖胚胎发育的潜在毒理效应,为进一步评估龟鳖养殖中因农药污染所引起安全风险提供基础性数据。

通讯作者简介:陆洪良(1980—),博士,副教授,主要从事两栖爬行动物生理生态与环境毒理学方面的研究工作。已发表

论文40余篇,其中SCI收录28篇。

参考文献 (References):

- [1] Duke S O, Powles S B. Glyphosate: A once-in-a-century herbicide [J]. Pest Management Science, 2008, 64(4): 319-325
- [2] 盖晓彤, 李鑫. 我国草甘膦与草铵膦登记情况及其市场前景[J]. 农药科学与管理, 2015, 36(7): 29-30
- Gai X T, Li X. Glyphosate and glufosinate ammonium registration and market in China [J]. Pesticide Science and Administration, 2015, 36(7): 29-30 (in Chinese)
- [3] Contardo-Jara V, Klingelmann E, Wiegand C. Bioaccumulation of glyphosate and its formulation Roundup Ultra in *Lumbriculus variegatus* and its effects on biotransformation and antioxidant enzymes [J]. Environmental Pollution, 2009, 157(1): 57-63
- [4] 范瑾煜, 耿金菊, 王晓蓉. 离子色谱法测定太湖水体中草甘膦含量[C]. 上海: 第六届全国环境化学大会, 2011: 222-223
- Fan J Y, Geng J J, Wang X R. Determination of glyphosate content in Taihu water body by ion chromatography [C]. Shanghai: the 6th National Conference on Environmental Chemistry, 2011: 222-223 (in Chinese)
- [5] 周垂帆, 李莹, 张晓勇, 等. 草甘膦毒性研究进展[J]. 生态环境学报, 2013, 22(10): 1737-1743
- Zhou C F, Li Y, Zhang X Y, et al. Research advance in ecotoxicity of glyphosate [J]. Ecology and Environmental Sciences, 2013, 22(10): 1737-1743 (in Chinese)
- [6] 张哲, 王江涛, 谭丽菊. 草甘膦对旋链角毛藻和盐生杜氏藻的毒性兴奋效应[J]. 生态毒理学报, 2010, 5(5): 685-691
- Zhang Z, Wang J T, Tan L J. Stimulation effect of glyphosate on *Chaetoceros curvisetus* and *Dunallelia salina* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2010, 5(5): 685-691 (in Chinese)
- [7] 王云彪, 李润琴, 邓茗岑, 等. 砷与农药草甘膦、敌敌畏对秀丽隐杆线虫的联合毒性[J]. 生态毒理学报, 2013, 8(2): 262-267
- Wang Y B, Li R Q, Deng M L, et al. Joint toxicity of arsenic, glyphosate and dichlorvos to *C. elegans* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2013, 8(2): 262-267 (in Chinese)
- [8] Folmar L C, Sanders H O, Julin A M. Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates [J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 1979, 8(3): 269-278
- [9] Mann R M, Bidwell J R. The toxicity of glyphosate and several glyphosate formulations to four species of southwestern Australian frogs [J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 1999, 36(2): 193-199
- [10] Howe C M, Berrill M, Pauli B D, et al. Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2004, 23(8): 1928-1938
- [11] 徐怡, 刘其根, 胡忠军, 等. 10种农药对克氏原螯虾幼虾的急性毒性[J]. 生态毒理学报, 2010, 5(1): 50-56
- Xu Y, Liu Q G, Hu Z J, et al. Acute toxicity of ten pesticides to larval red swamp crayfish *Procambarus clarkii* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2010, 5(1): 50-56 (in Chinese)
- [12] 王米道, 程凤侠, 司友斌. 铜与草甘膦复合污染对小麦种子发芽与根伸长的抑制作用[J]. 生态毒理学报, 2009, 4(4): 591-596
- Wang M D, Cheng F X, Si Y B. The inhibition of the combined pollution of copper and glyphosate to the seed germination and root elongation of wheat [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2009, 4(4): 591-596 (in Chinese)
- [13] 王玉军, 周东美, 孙瑞娟, 等. 土壤中草甘膦与镉的交互作用对3种土壤酶活性的影响[J]. 生态毒理学报, 2006, 1(1): 58-63
- Wang Y J, Zhou D M, Sun R J, et al. Effects of glyphosate and Cd interaction on the activities of several soil enzymes [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2006, 1(1): 58-63 (in Chinese)
- [14] Damstra T, Barlow S, Bergman Å, et al. Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors [R]. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2002
- [15] Vandenberg L N, Blumberg B, Antoniou M N, et al. Is it time to reassess current safety standards for glyphosate-based herbicides? [J]. Journal of Epidemiology and Community Health, 2017, 71(6): 613-618
- [16] Koller V J, Fürhacker M, Nersesyan A, et al. Cytotoxic and DNA-damaging properties of glyphosate and Roundup in human-derived buccal epithelial cells [J]. Archives of Toxicology, 2012, 86(5): 805-813
- [17] Mesnage R, Renney G, Séralini G E, et al. Multiomics reveal non-alcoholic fatty liver disease in rats following chronic exposure to an ultra-low dose of Roundup herbicide [J]. Scientific Reports, 2017, 7: 39328
- [18] Gluszcak L, Miron D D S, Moraes B S, et al. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, 2007, 146(4): 519-524
- [19] 范瑾煜. 水环境中低浓度草甘膦及制剂对鲫鱼的毒性

- 效应研究[D]. 南京: 南京大学, 2013: 15-44
- Fan J Y. The toxicological effects of low concentration of glyphosate and its Roundup® formulation in aquatic environment on *Carassius auratus* [D]. Nanjing: Nanjing University, 2013: 15-44 (in Chinese)
- [20] Cavaş T, Könen S. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay [J]. *Mutagenesis*, 2007, 22(4): 263-268
- [21] Relyea R A, Jones D K. The toxicity of Roundup Original Max® to 13 species of larval amphibians [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2009, 28(9): 2004-2008
- [22] 王瀛寰, 王会利, 张艳峰, 等. 爬行动物应用于毒理学研究的现状[J]. *生态毒理学报*, 2012, 7(6): 585-592
- Wang Y H, Wang H L, Zhang Y F, et al. Application of reptiles in toxicology research: A review [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2012, 7(6): 585-592 (in Chinese)
- [23] Sparling D W, Matson C, Bickham J, et al. Toxicity of glyphosate as Glypro® and LI700 to red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*) embryos and early hatchling [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2009, 25(10): 2768-2774
- [24] Willingham E. Embryonic exposure to low-dose pesticides: Effects on growth rate in the hatchling red-eared slider turtle [J]. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 2001, 64(3): 257-272
- [25] Podreka S, Georges A, Maher B, et al. The environmental contaminant DDE fails to influence the outcome of sexual differentiation in the marine turtle *Chelonia mydas* [J]. *Environmental Health Perspectives*, 1998, 106(4): 185-188
- [26] Milnesa M R, Allen D, Bryan T A, et al. Developmental effects of embryonic exposure to toxaphene in the American alligator (*Alligator mississippiensis*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 2004, 138(1): 81-87
- [27] Wu B F, Liang L, Ma L, et al. Effects of pesticide exposure on embryonic development and hatchling traits of turtles [J]. *Asian Herpetological Research*, 2016, 7(1): 28-33
- [28] Solla S R D, Palonen K E, Martin P A. Toxicity of pesticides associated with potato production, including soil fumigants, to snapping turtle eggs (*Chelydra serpentina*) [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2014, 33(1): 102-106
- [29] Greulich K, Pflaumacher S. Differences in susceptibility of various life stages of amphibians to pesticide exposure [J]. *Aquatic Toxicology*, 2003, 65(3): 329-336
- [30] 侯立静, 杨晓梅, 马跃, 等. 丙线磷对中华大蟾蜍早期胚胎发育的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2005, 24(4): 682-668
- Hou L J, Yang X M, Ma Y, et al. Effects of ethopropbos on early-stage embryonic development of *Bufo bufo garizans* [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2005, 24(4): 682-668 (in Chinese)
- [31] Smith P N, Cobb G P, Godard-Coding C, et al. Contaminant exposure in terrestrial vertebrates [J]. *Environmental Pollution*, 2007, 150(1): 41-64
- [32] Beldomenico P M, Rey F, Prado W S, et al. In ovum exposure to pesticides increases the egg weight loss and decreases hatchlings weight of *Caiman latirostris* (Crocodylia: Alligatoridae) [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2007, 68(2): 246-251
- [33] Willingham E J, Crews D. Sex reversal effects of environmentally relevant pesticide concentrations on the red-eared slider turtle, a species with temperature-dependent sex determination [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 1999, 113(3): 429-435
- [34] Bergeron J M, Crews D, McLachlan J A. PCBs as environmental estrogens: Turtle sex determination as a biomarker of environmental contamination [J]. *Environmental Health Perspectives*, 1994, 102(9): 780-786
- [35] Guillette L J, Gross T S, Masson G R, et al. Developmental abnormalities of the reproductive system of the American alligator (*Alligator mississippiensis*) from contaminated and control lakes in Florida [J]. *Environmental Health Perspectives*, 1994, 102: 680-688
- [36] Guillette L J, Pickford D B, Crain D A, et al. Reduction in penis size and plasma testosterone concentrations in juvenile alligators living in a contaminated environment [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 1996, 101(1): 32-42
- [37] Loutchanwoot P, Srivilai P, Jarry H. The influence of equol on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis and hepatic lipid metabolic parameters in adult male rats [J]. *Life Sciences*, 2015, 128: 1-7
- [38] Golshan M, Hatef A, Zare A, et al. Alternations in neuroendocrine and endocrine regulation of reproduction in male goldfish (*Carassius auratus*) following an acute and chronic exposure to vinclozolin, *in vivo* [J]. *Aquatic Toxicology*, 2014, 155(4): 73-83
- [39] Makynen E A, Kahl M D, Jensen K M, et al. Effects of the mammalian antiandrogen vinclozolin on development and reproduction of the fathead minnow (*Pimephales promelas*) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2000, 48(4): 461-475
- [40] Modesto K A, Martinez C B R. Effects of Roundup Tran-

- sorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity [J]. *Chemosphere*, 2010, 81(6): 781-787
- [41] Costa M J, Monteiro D A, Oliveira-Neto A L, et al. Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original® [J]. *Ecotoxicology*, 2008, 17(3): 153-163
- [42] 曾明, 黄婷, 易吉平, 等. 草甘膦对 GC-1 小鼠精原细胞的毒性作用及 NAC 的干预效应 [J]. *生态毒理学报*, 2014, 9(1): 159-166
- Zeng M, Huang T, Yi J P, et al. Cytotoxicity of glyphosate to GC-1 mice spermatogonium and antagonistic effect of N-acetylcysteine [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2014, 9(1): 159-166 (in Chinese)
- [43] Wang Y B, Ezemaduka A N, Li Z H, et al. Joint toxicity of arsenic, copper and glyphosate on behavior, reproduction and heat shock protein response in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2017, 98(4): 465-471
- [44] Rhee J S, Raisuddin S, Lee K W, et al. Heat shock protein (Hsp) gene responses of the intertidal copepod *Tigriopus japonicus* to environmental toxicants [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 2009, 149(1): 104-112
- [45] 汪立高, 杨仁斌, 魏凤. 土壤中残留草甘膦检测方法及其消解动态研究 [J]. *湖南农业科学*, 2011(23): 85-88
- Wang L G, Yang R B, Feng W. Detection method and degradation dynamics of isopropylamine salt of glyphosate in soil [J]. *Hunan Agricultural Sciences*, 2011(23): 85-88 (in Chinese) ◆