

# 氧化乐果对红瘰疣螈胚胎及蝌蚪生长发育的影响

杨国辉, 张景涛, 陈礼仙

(大理大学农学与生物科学学院, 云南大理 671003)

**摘要:** 本文研究了氧化乐果对红瘰疣螈 *Tylostotriton shanjing* 胚胎及蝌蚪生长发育的影响。结果表明, 氧化乐果对红瘰疣螈胚胎发育过程中的出膜期和开口期毒性较大, 其余各期毒性较小。随着氧化乐果浓度的增大, 红瘰疣螈的畸形率和死亡率逐渐增大。gosner22 期蝌蚪的安全浓度是  $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在安全浓度内,  $0.03 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  氧化乐果溶液对蝌蚪的生长具有明显的促进作用, 浓度高于  $0.03 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  则对蝌蚪的生长发育有明显的滞育作用, 对其生长的影响主要表现在 10 d 以后, 这与处理时间延长, 毒物在蝌蚪体内富集有关。氧化乐果对红瘰疣螈胚胎及蝌蚪生长发育有显著的影响和损伤, 该研究为农业生产科学合理使用农药提供了依据。

**关键词:** 氧化乐果; 红瘰疣螈; 胚胎期; 蝌蚪期; 毒性

**中图分类号:** S482.3+3; Q959.5+2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-7083(2017)04-0431-05

## Toxicity of Omethoate to Embryos and Larvae of *Tylostotriton shanjing*

YANG Guohui, ZHANG Jingtao, CHEN Lixian

(College of Agriculture and Biology Science, Dali University, Dali, Yunnan Province 671003, China)

**Abstract:** The toxicity of omethoate to the embryos and larvae of *Tylostotriton shanjing* was studied by acute toxic test. The results showed that the toxicity of omethoate on the *T. shanjing* embryos was greater during hatching and mouth open stages than the others. With the increase of the concentration, deformity and mortality of the embryos increased gradually. The safe concentration of omethoate on *T. shanjing* tadpoles was  $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . Within the safe concentration ( $0.03 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), the growth of tadpoles promoted significantly. The growth of tadpoles would diapause when the concentration was higher than  $0.03 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . The effect on the tadpoles mainly appeared after 10 days since the omethoate could be concentrated in tadpoles along with time. The study suggested that omethoate had a significant impact on the growth of embryos and larvae of *T. shanjing*, and provided a reference to the rational usage of the pesticides.

**Keywords:** omethoate; *Tylostotriton shanjing*; embryos period; larvae period; toxicity

我国是农药生产和使用大国。据统计, 2015 年我国农药使用量为 92.64 万吨(束放等, 2016)。农药能有效控制病虫害, 确保农作物增产增收, 但不合理的使用会造成生态环境污染。目前我国存在农药使用不合理的问题, 已经造成严重的生态污染, 并危及到人类健康(郭晨, 2016)。

氧化乐果化学名为 O, O-二甲基-S-[2-(甲胺基)-2-氧代乙基]硫代磷酸酯, 是一种高效有机磷杀虫剂, 由于价格低, 效果好, 在国内农业生产中广泛使用。目前, 国内外对氧化乐果的研究主要集中在氧化乐果的降解和植物吸收上(潘奇正等, 2013; 吴虹玥等, 2013; Zhang *et al.*, 2014), 对两栖动物的毒理方面研究不多, 仅有 Isnas 等(2012)就其对湖蛙

*Rana ridibunda* 各种组织氧化应激标志物的影响, 以及张明旺等(2013)对中华蟾蜍 *Bufo gargarizans* 蝌蚪进行了氧化乐果的急性毒性研究。

两栖类具有高渗透性的皮肤和无羊膜的卵, 对生活环境的化学污染物较为敏感, 因此可作为环境监测的指示生物。近年来关于农业污染物对两栖类的影响已有大量报道, 但集中在无尾两栖类(卢祥云等, 2002; 周景明等, 2006; 尹晓辉, 2008; 张明旺等, 2013)。红瘰疣螈 *Tylostotriton shanjing* 是分布于我国云南中西部的一种有尾两栖类, 国家 II 级重点保护野生动物(赵尔宓, 1998)。本文以红瘰疣螈为试验对象, 研究了氧化乐果对其胚胎期及蝌蚪期的毒性影响, 为更好地保护该物种和合理使用农药提供了依据。

收稿日期: 2017-01-25 接受日期: 2017-04-26

基金项目: 中国三江并流区域生物多样性协同创新中心; 大理大学实验教学示范中心建设项目(X-SYZX-3); 云南省教育厅科研项目(2015Y388)

作者简介: 杨国辉(1970—), 女, 高级实验师, 硕士, 主要从事动物学研究, E-mail: yanggh727@sina.com

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**1.1.1 试验材料** 2011 年 5 月和 2015 年 6 月(由于云南干旱和红瘰疣螈野外栖息地被破坏,2012—2014 年野外未收集到足够的待繁殖成体,故于 2015 年才进行补充试验),将采自云南大理苍山国家级自然保护区的红瘰疣螈雌雄待繁殖个体带回本实验室的水族箱中饲养,室温 19 ~ 22 °C,水族箱底部铺上适量的沙石,并种植标本采集地的水生植物,放入适量的水、水藻和少量田螺及水蚯蚓,3 d 更换一次水。待雌性产卵后,立即收集受精卵,镜检,剔除未受精的卵。受精卵一部分直接用于胚胎期毒性试验,另一部分置于大水槽中正常培养至蝌蚪期用于蝌蚪期毒性试验。

**1.1.2 试验试剂** 氧化乐果为山东大成农药股份有限公司生产的 40% 氧化乐果乳油。

### 1.2 方 法

**胚胎期:**参考大田使用的浓度进行预试,找出氧化乐果作用的大致浓度范围,即出现全部死亡的最低浓度。然后依次设计 30 mg · L<sup>-1</sup>、15 mg · L<sup>-1</sup>、8 mg · L<sup>-1</sup>、4 mg · L<sup>-1</sup> 4 个浓度梯度。将同一批次的红瘰疣螈受精卵随机 30 粒一组,分别放入盛有供试浓度梯度氧化乐果溶液的培养皿内。设 2 个平行组和 1 个对照组,试验在室内进行,水温 22 °C ± 0.5 °C。按胚胎发育的各个时期(杨国辉等,2011)进行连续观察。畸形胚胎表现为腹部膨胀透明、全身皱缩卷曲、脊柱弯曲等,死亡胚胎表现为胚胎停止发育。试验过程中记录畸形数和死亡数,死亡胚胎予以剔除,统计平均值。

**蝌蚪期:**试验采用刚出膜的蝌蚪,参照无尾两栖类的 gosner 分期标准,从后肢芽发育开始为蝌蚪期,红瘰疣螈胚胎发育共 22 期,试验蝌蚪即处于 gosner 22 期,此时的蝌蚪前肢芽末端分成三叉,后肢芽出现,色斑增多加深,出膜(赵尔宓,1990;杨国辉等,2011)。预试时,将 gosner 22 期的红瘰疣螈蝌蚪进行 24 h、48 h、72 h 和 96 h 半致死浓度(LC<sub>50</sub>)测定,水温 22.5 ~ 23.5 °C, pH 6.8 ~ 7.6,统计染毒个体死亡数,计算 LC<sub>50</sub> 和安全浓度(贾春生,2006)。在安全浓度下设 5 个梯度,每 20 只蝌蚪为一组,置于大水槽内,设 2 个平行组和 1 个对照组,每 24 h 更换一次

培养溶液,清理食物残渣、排泄物和死亡的蝌蚪。蝌蚪体长用生物体视成像系统(NIKON-SMZ1000)测量、记录,体质量是将蝌蚪从染毒溶液中取出放入赛多利斯分析天平(AB204-S)内 1 个盛有 10 mL 水(22 °C ± 0.5 °C)的培养皿内称量,结束后再次放置于染毒溶液中。试验持续 25 d,直至蝌蚪变态结束,每 5 d 测量一次蝌蚪的体长、体质量。

### 1.3 统计分 析

胚胎期试验数据用 Excel 和 SPSS 16.0 进行统计分析;对试验前不同浓度组蝌蚪生长指标的差异用单因素方差分析(One-Way ANOVA)及 *t*<sup>2</sup> 检验(双样本等方差假设),并对试验前后蝌蚪体质量、体长的增长率进行回归分析,数据以平均值 ± 标准误表示,显著性水平设置为 α = 0.05。

## 2 结果与分 析

### 2.1 氧化乐果对红瘰疣螈胚胎发育的毒性影响

为便于统计,本文将红瘰疣螈胚胎发育的 22 个时期分为细胞期、囊胚期、原肠胚期、神经胚期、外腮期、开口期及出膜期,各期历时按 60% 个体数均发育到此时期为标准。试验发现,氧化乐果对胚胎发育的影响主要在开口期和出膜期,其余各期受毒性影响不明显(图 1,图 2)。

在正常发育条件下,红瘰疣螈胚胎很少发生畸形。本试验中红瘰疣螈从囊胚期开始出现畸形,且随着氧化乐果浓度的增大,畸形率逐渐升高(图 1)。畸形胚胎与正常胚胎在形态上有很大差异:神经胚期前畸形发生在胚胎背唇及胚孔附近,主要表现为腹部膨胀呈透明状,胚体弯曲,全身皱缩卷曲,一段时间后死亡;神经胚期后畸形多发生在胚胎的脊椎部位,主要表现为尾部弯曲,但胚体能继续发育,在蝌蚪早期死亡(图版 I)。

自然状态下,红瘰疣螈胚胎的死亡率较低,全部都能正常发育。试验结果显示,随着氧化乐果浓度的增大,红瘰疣螈的死亡率逐渐升高,且呈线性增长(图 2),出膜期和开口期受毒性影响较大,其余各期影响较小。出膜期后胚胎脱离卵胶膜的保护,农药成分可直接渗透进入正在发育中的胚胎,导致胚胎畸形和死亡;而开口期后,蝌蚪开始主动吞咽,氧化乐果随水流进入蝌蚪体内,导致死亡率升高。

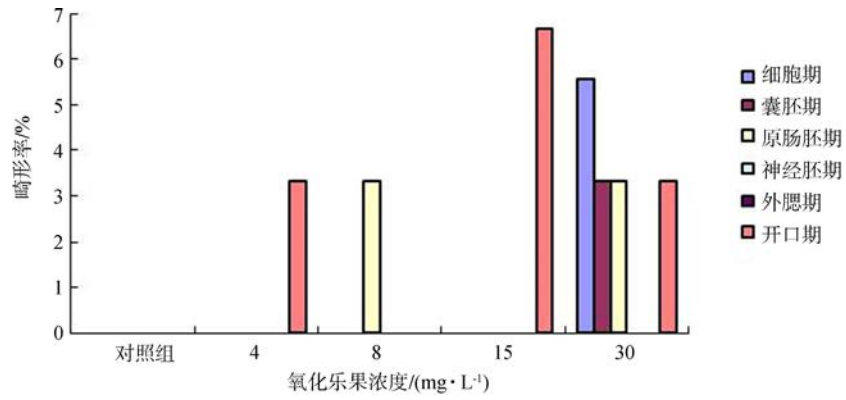


图 1 不同浓度氧化乐果对红瘰疣螈胚胎的致畸率

Fig. 1 Malformation rate of *Tylotriton shanjing* embryos exposed to different concentrations of omethoate

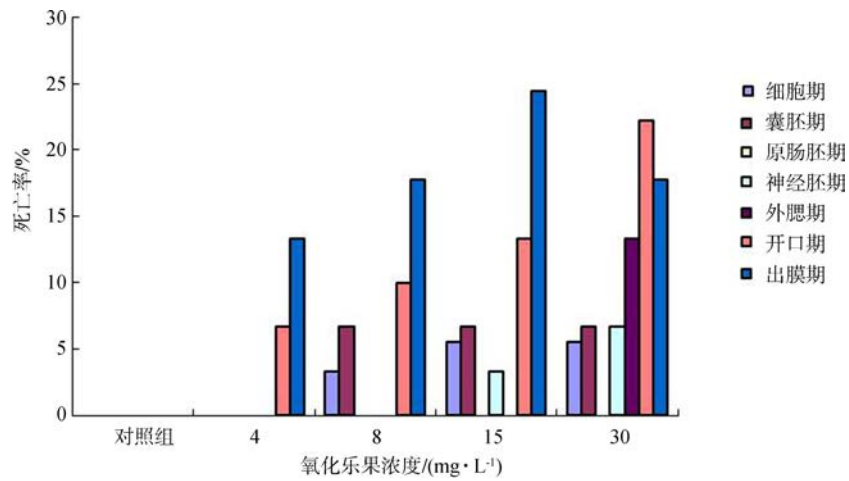
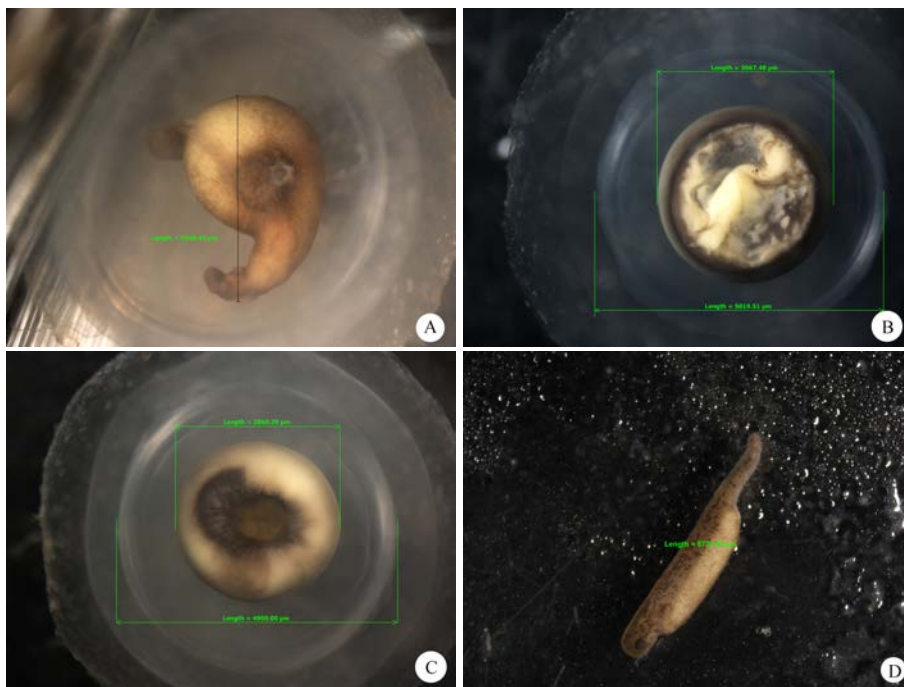


图 2 不同浓度氧化乐果对红瘰疣螈胚胎的致死率

Fig. 2 Death rate of *Tylotriton shanjing* embryos exposed to different concentrations of omethoate



图版 I 胚胎畸形: 尾部弯曲 (A), 胚胎畸形: 皱缩卷曲 (B), 死亡胚胎 (C), 蝌蚪畸形 (D)

Plate I Embryo malformation: tail curved (A), embryo malformation: crimped of embryo (B), embryonic death (C), tadpole deformity (D)

2.2 氧化乐果对红瘰疣螈蝌蚪生长的影响

2.2.1 氧化乐果染毒 24 ~ 96 h 红瘰疣螈蝌蚪的 LC<sub>50</sub> 及安全浓度

gosner22 期红瘰疣螈蝌蚪 24 h、48 h、72 h 和 96 h 的 LC<sub>50</sub> 分别为 1.62 mg · L<sup>-1</sup>、0.79 mg · L<sup>-1</sup>、0.48 mg · L<sup>-1</sup>、0.61 mg · L<sup>-1</sup>，安全浓度为 0.05 mg · L<sup>-1</sup>。

2.2.2 氧化乐果对红瘰疣螈蝌蚪生长的影响 试验前,各浓度组中蝌蚪的各项生长指标差异较小,经单因素方差分析,其体长、体质量差异均无统计学意义 ( $F = 1.57, P > 0.05; F = 1.38, P > 0.05$ )。而试验结果显示,与对照组相比,0.03 mg · L<sup>-1</sup> 浓度下蝌蚪体质量增长量最大,0.05 mg · L<sup>-1</sup> 浓度下蝌蚪体质量出现负增长,蝌蚪在不同浓度氧化乐果下体长增长量大

小依次是 0.03 mg · L<sup>-1</sup> > 0.02 mg · L<sup>-1</sup> > 对照组 > 0.01 mg · L<sup>-1</sup> > 0.04 mg · L<sup>-1</sup> > 0.05 mg · L<sup>-1</sup>。在试验中,氧化乐果浓度在染毒早期(0 ~ 10 d)对蝌蚪体长、体质量的生长无滞育作用 ( $F = 1.44, P > 0.05; F = 1.29, P > 0.05$ );当染毒到 15 d 时,氧化乐果浓度在 0 ~ 0.02 mg · L<sup>-1</sup> 蝌蚪的体长和体质量变化不明显 ( $F = 1.68, P > 0.05; F = 1.55, P > 0.05$ ),随着染毒浓度的增加,蝌蚪的体长和体质量出现停滞,各浓度染毒组之间差异有统计学意义 ( $F = 2.16, P < 0.05; F = 3.04, P < 0.01$ ) (表 1)。

对各生长指标的增长率与氧化乐果浓度作相关分析,结果表明,红瘰疣螈蝌蚪各个生长指标的增长率与氧化乐果浓度呈显著负相关(表 2)。

表 1 氧化乐果对红瘰疣螈蝌蚪生长的影响  
Table 1 Effect of omethoate concentration on the growth of *Tylotriton shanjing* tadpoles

氧化乐果浓度 / (mg · L <sup>-1</sup> )	生长指标	0 d	5 d	10 d	15 d	20 d	25 d	变化量
对照组	体质量/g	148.6 ± 0.11	148.8 ± 0.10	149.2 ± 0.13	149.5 ± 0.20	150.1 ± 0.14	150.5 ± 0.14	2.0 ± 0.13
	体长/mm	21.1 ± 0.10	21.1 ± 0.14	21.5 ± 0.30	22.1 ± 0.10	22.5 ± 0.20	23.1 ± 0.10	1.9 ± 0.10
0.01	体质量/g	148.8 ± 0.13	148.8 ± 0.14	149.1 ± 0.11	149.8 ± 0.21	149.9 ± 0.15	150.4 ± 0.12	1.2 ± 0.11
	体长/mm	22.1 ± 0.10	22.1 ± 0.20	22.3 ± 0.10	22.6 ± 0.10	22.9 ± 0.10	23.3 ± 0.10	1.6 ± 0.10
0.02	体质量/g	147.8 ± 0.12	147.9 ± 0.10	148.1 ± 0.22	148.6 ± 0.15	149.2 ± 0.16	150.1 ± 0.17	1.2 ± 0.21
	体长/mm	21.6 ± 0.10	21.6 ± 0.10	21.8 ± 0.20	21.9 ± 0.20	22.3 ± 0.10	22.8 ± 0.20	2.3 ± 0.20
0.03	体质量/g	146.3 ± 0.13	146.3 ± 0.24	146.9 ± 0.16	150.3 ± 0.23	150.9 ± 0.20	152.7 ± 0.14	2.3 ± 0.15
	体长/mm	22.8 ± 0.10	22.9 ± 0.20	23.1 ± 0.10	23.9 ± 0.10	24.5 ± 0.20	25.1 ± 0.10	6.3 ± 0.20
0.04	体质量/g	148.7 ± 0.22	148.5 ± 0.14	148.3 ± 0.23	148.2 ± 0.16	145.4 ± 0.30	142.7 ± 0.15	0.4 ± 0.10
	体长/mm	21.5 ± 0.10	21.5 ± 0.20	21.6 ± 0.10	21.7 ± 0.10	21.8 ± 0.10	21.9 ± 0.20	-6.0 ± 0.10
0.05	体质量/g	150.2 ± 0.13	150.0 ± 0.31	150.0 ± 0.13	147.6 ± 0.14	145.3 ± 0.31	142.9 ± 0.15	-0.8 ± 0.12
	体长/mm	22.4 ± 0.10	22.4 ± 0.10	22.3 ± 0.10	22.1 ± 0.20	21.8 ± 0.10	21.6 ± 0.10	-7.3 ± 0.10

表 2 不同浓度氧化乐果对对照组红瘰疣螈蝌蚪生长指标增长率的相关关系  
Table 2 Correlational relationship between the growth rate of *Tylotriton shanjing* tadpoles and the concentration of omethoate

生长指标 (变化量)	氧化乐果浓度 / (mg · L <sup>-1</sup> )						一元回归方程
	对照组	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	
体质量/g	2.0	1.2	1.2	2.3	0.4	-0.8	$y = -0.075x + 0.1$
体长/mm	1.9	1.6	2.3	6.3	-6.0	-7.3	$y = -0.0304x - 0.002$

3 讨论

众所周知,两栖类动物人工繁殖快,生长周期短,易于培养和观察,其胚胎发育过程对水环境的化学污染物敏感,作为水体有害物质及水质监测的指示生物被广泛应用(周景明等,2006)。目前,对两栖类的毒性影响研究主要集中在无尾两栖类(李贞等,2010),有尾两栖类的毒性影响与无尾两栖类之间是否存在差异,还有待进一步研究。

3.1 红瘰疣螈发育过程对氧化乐果耐受差

试验中红瘰疣螈蝌蚪安全浓度为 0.05 mg · L<sup>-1</sup>, 低于胚胎期处理浓度,这是因为胚胎发育过程在卵胶膜内进行,卵胶膜能有效阻止毒物进入,而蝌蚪期的个体直接浸泡在毒物中,其安全浓度较胚胎期低。与无尾两栖类相比,红瘰疣螈蝌蚪期的安全浓度也低于中华蟾蜍(6.5 mg · L<sup>-1</sup>) (张明旺等,2013),这可能与红瘰疣螈长期生活在无污染的山涧中有关。

### 3.2 氧化乐果对红瘰疣螈胚胎及蝌蚪的影响

氧化乐果对红瘰疣螈胚胎具有明显的致畸、致死作用,影响主要发生在出膜期和开口期,其余各期受毒性影响不明显,随着氧化乐果浓度的升高,红瘰疣螈胚胎的畸形率和死亡率逐渐升高,这与其他两栖类研究结果一致(汪学英等,2001)。

氧化乐果对红瘰疣螈蝌蚪的生长具有非常显著的抑制作用,其影响主要表现在10 d以后。随着氧化乐果浓度增大和处理时间延长,蝌蚪的体质量和体长均出现负生长,可能与处理时间延长、毒物在蝌蚪体内富集有关。

在安全浓度内,低浓度( $0.03 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )的氧化乐果对红瘰疣螈蝌蚪的生长有一定的促进作用,而高浓度( $>0.03 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )对蝌蚪的生长发育有明显的滞育作用。这与中华蟾蜍的毒性实验(尹晓辉,2008;张明旺等,2013)的研究结果一致,可能与蝌蚪在低浓度农药下能产生一定的应激反应,加强了抵抗力有关。

总之,氧化乐果对红瘰疣螈胚胎具有明显的致畸、致死作用,滥用氧化乐果农药可能导致红瘰疣螈生长发育异常,建议农业生产中尽量科学合理使用。

#### 参考文献:

- 郭晨. 2016. 高危农药:健康和环境的杀手[J]. 生态经济, 32(7): 7-9.
- 贾春生. 2006. 利用SPSS软件计算杀虫剂的 $LC_{50}$ [J]. 昆虫知识, 43(4): 414-417.
- 李贞, 李丕鹏, 徐齐艳, 等. 2010. 农药和化肥对无尾两栖类蝌蚪的毒性效应研究进展[J]. 生态毒理学报, 5(2): 287-294.
- 卢祥云, 陈海波, 韩曜平. 2002. 几种农药对黑斑蛙胚胎及蝌蚪的毒性[J]. 四川动物, 21(2): 84-85.
- 潘奇正, 侯雪, 时佳宏. 2013. 氧化乐果对大鼠体内氧化应激和脂代谢水平的影响[J]. 中国老年学杂志, 33(15): 3695-3697.
- 束放, 熊延坤, 韩梅. 2016. 2015年我国农药生产与使用概况[J]. 农药科学与管理, 37(7): 10-14.
- 汪学英, 卢祥云, 李春梅, 等. 2001. 重金属离子对黑斑蛙胚胎及蝌蚪的毒性影响[J]. 四川动物, 20(1): 59-61.
- 吴虹玥, 张静恒, 方晓燕. 2013. 气相色谱-串联质谱法测定食用菌中氧化乐果残留[J]. 浙江农业科学, (3): 304-306.
- 杨国辉, 杨自忠, 李孟然, 等. 2011. 红瘰疣螈胚胎发育的初步观察[J]. 生物学通报, 46(8): 51-52.
- 尹晓辉. 2008. 几种农药对中华蟾蜍的生态毒理效应及分子毒性研究[D]. 上海: 东华大学.
- 张明旺, 黄忆湄, 席蓉, 等. 2013. 稻瘟灵和乐果对中华蟾蜍蝌蚪的急性毒性实验研究[J]. 四川农业大学学报, 31(1): 79-82.
- 赵尔宓. 1998. 中国濒危动物红皮书:两栖类和爬行类[M]. 北京: 科学出版社.
- 赵尔宓. 1990. 介绍一种蛙类胚胎及蝌蚪发育的分期[J]. 生物学通报, 39(1): 13-15.
- 周景明, 秦占芬, 徐晓白. 2006. 两栖类动物在环境毒理学研究中的应用学[J]. 环境与健康, 23(4): 369-371.
- Isnas M, Yegin E, Celik I. 2012. Effects of omethoate on certain oxidative biomarkers in various tissues of frogs (*Rana ridibunda*) at acute exposure [J]. Toxicology and Industrial Health, 28(1): 27-34.
- Zhang Y, Ren M, Li J, et al. 2014. Does omethoate have the potential to cause insulin resistance [J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 37(1): 284-290.