ISSN 1000-0933
CN 11-2031/Q

生态学报
Acta Ecologica Sinica

第32卷 第11期 Vol.32 No.11 2012

中国生态学学会
中国科学院生态环境研究中心 主办
科学出版社 出版

中国科学院科学出版基金资助出版

生 态 学 报

（SHENGTAI XUEBAO）

第 32 卷 第 11 期　　2012 年 6 月　（半月刊）

目　　次

期刊基本参数：CN 11-2031/Q * 1981 * m * 16 * 342 * zh * P * ￥70.00 * 1510 * 37 * 2012-06

封面图说：爬升樟木沟的暖湿气流——樟木沟是中国境内横切喜马拉雅山脉南坡的几条著名大沟之一，它位于我国西藏聂拉木县境内的希夏邦马峰东南侧，延绵 5400km 的 318 国道在此沟中到达其最西头。从聂拉木县城到樟木口岸短短的 30km 中，海拔从 4000m 急降至 2000m。在大气环流作用下，来自印度洋的暖湿气流沿樟木沟不断费力地往上爬升，给该沟谷留下了大量的降水。尤其是在雨季到来时，山间到处是流水及悬垂崖头的瀑布，翠峰直插云霄，森林茂密苍郁，溪流碧澄清澈，奇花异葩繁多，风景美如画卷，气势壮丽非凡。

彩图提供：陈建伟教授　北京林业大学　E-mail：cites.chenjw@163.com

DOI: 10.5846/stxb201105160636
王娜,邵晨,颉志刚,凌云,程东海.低温胁迫下虎纹蛙的生存力及免疫和抗氧化能力.生态学报,2012,32(11):3538-3545.
Wang N, Shao C, Xie Z G, Ling Y, Cheng D H. Viability and changes of physiological functions in the tiger frog (*Hoplobatrachus rugulosus*) exposed to cold stress. Acta Ecologica Sinica,2012,32(11):3538-3545.

低温胁迫下虎纹蛙的生存力及免疫和抗氧化能力

王　娜,邵　晨,颉志刚*,凌　云,程东海
(浙江师范大学化学与生命科学学院生态研究所,金华　321004)

摘要:全球气候变化是造成世界范围内两栖类种群衰退和灭绝的重要因素之一。随着极端天气出现变得日趋频繁,非季节性的、短期且剧烈的气温变化可能会严重干扰两栖类动物的生存与种群稳定。监测了浙江省金华市南山野生虎纹蛙(*Hoplobatrachus rugulosus*)分布区冬季的环境气温,并参考监测数据在实验室条件下研究了虎纹蛙在短期梯度降温(2 ℃/ 24 h)和急性冷暴露(即冷休克)(2 ℃)下的生存力及冷休克对机体免疫功能和抗氧化能力的影响。结果表明,虎纹蛙在冬季(2009-12-01—2010-03-31)经历的温度范围普遍在 0—14 ℃之间,主要遭遇的低温区间在 0—4 ℃,主要高温区间在 10—14 ℃。通过梯度降温实验,发现温度降至 12 ℃累积死亡率约为 28.1%,10 ℃为 87.5%,8 ℃为 100%。在一定温度范围内,虎纹蛙死亡率与环境温度呈显著负相关(Pearson test, $r=-0.952$, $P<0.05$)。经曲线拟合,回归方程计算可得半数致死温度为 11.5 ℃。虎纹蛙在冷休克处理下,在第 6 h 累积死亡率为 45%,12 h 为 80%,24 h 达到 100%。虎纹蛙死亡率与冷休克时间呈显著正相关(Pearson test, $r=0.91$, $P<0.05$),半数致死时间为 7.6 h。此外,冷休克(2 ℃,6 h)显著抑制了虎纹蛙脾脏巨噬细胞呼吸爆发强度($t=3.827$, $df=6$, $P<0.05$)、全血吞噬活性($t=5.388$, $df=3.037$, $P<0.05$)及胃溶菌酶活力($t=6.37$, $df=6$, $P<0.05$);肝脏($t=0.773$, $df=8$, $P>0.05$)和肾脏($t=0.164$, $df=4.542$, $P>0.05$)组织脂质过氧化物产物丙二醛(MDA)的含量虽无明显变化,但肝脏($t=-2.817$, $df=6$, $P<0.05$)和肾脏($t=-11.302$, $df=6$, $P<0.05$)组织抗氧化物谷胱甘肽(GSH)含量及肝脏($t=-3.3$, $df=6$, $P<0.05$)超氧化物歧化酶(SOD)活性均显著升高。上述结果表明虎纹蛙对低温较为敏感,冷休克能够诱导机体的免疫抑制,并导致机体对抗氧化物质需求的增加。可以推测,当遭遇极端低温天气时,低温胁迫可能会严重干扰虎纹蛙生理机能,加大种群的生存压力和疾病感染的风险。

关键词:虎纹蛙;低温胁迫;冷休克;免疫力;抗氧化物

Viability and changes of physiological functions in the tiger frog (*Hoplobatrachus rugulosus*) exposed to cold stress

WANG Na, SHAO Chen, XIE Zhigang*, LING Yun, CHENG Donghai
Institute of Ecology, College of Chemistry and Life Science, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, *China*

Abstract: Global climate change has been considered to be one of the key factors leading to declines and losses of amphibian populations. Though global warming is one of the acknowledged causes of fluctuations of amphibian population worldwide, unseasonal sharp fall in air temperature as result of global climate change may also affect the survival and stability of amphibian population severely. As amphibians are typical poikilothermic animals, environmental temperature can influence their physiological functions and enhance their susceptibility to infectious diseases. The immunological competence of amphibians may, therefore, make them vulnerable to parasites and disease particularly after discontinuous and extreme events (e. g. winter rainfall, late spring coldness). In this article, we have investigated how cold stress affected the physiology and viability of tiger frogs (*Hoplobatrachus rugulosus*). The winter temperatures experienced by wild

基金项目:国家自然科学基金项目(30800129)
收稿日期:2011-05-16;　　**修订日期**:2011-10-31
* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: xiezhigang@zjnu.cn

tiger frogs in natural winter in the Southern Mountain of Jinhua in Zhejiang Province was monitored, and then replicated in subsequent experiments. The aim of the experiments was to determine how gradient cooling (2 ℃/24 h) and cold shock (2 ℃) affected the mortality rate of tiger frogs, and affected various aspects of their immune function and oxidation resistance. The results showed that the survival temperature range of wild overwintering was between 0—14 ℃ in 12/1/2009—3/31/2010, and minimum and maximum temperature ranged between 0—4 ℃ and 10—14 ℃ respectively. During the process of gradient cooling, we found that the accumulated mortality rate was 28.1% at 12 ℃, 87.5% at 10 ℃ and 100% at 8 ℃. A significant negative correction was found between environmental temperature and frog mortality within a certain temperature range (Pearson test, $r=-0.952$, $P<0.05$). And lethal temperature of 50% occurred at 11.2 ℃ based on a fitted curve regression equation. Under cold shock, 45% mortality was observed after being directly stimulated at 2 ℃ for 6 h, 80% mortality appeared at 2 ℃ for 12 h, and increased to 100% after 24 h. There appeared to be positive correction between cold shock time and mortality (Pearson test, $r=0.91$, $P<0.05$), and lethal time of 50% is 7.6 h at 2 ℃ according to fitted curve regression equation. Moreover, cold shock significantly inhibited the respiratory burst of spleen macrophages ($t=3.827$, $df=6$, $P<0.05$), peripheral blood phagocytic activity ($t=5.388$, $df=3.037$, $P<0.05$) and gastric lysozyme activity ($t=6.37$, $df=6$, $P<0.05$) at 2 ℃ for (6 h). Although there was no significant change in malonaldehyde (MDA) content, the glutathione (GSH) content of the liver ($t=-2.817$, $df=6$, $P<0.05$) and kidney ($t=-11.302$, $df=6$, $P<0.05$) increased. The activity of superoxide dismutase (SOD) also increased significantly in the liver ($t=-3.3$, $df=6$, $P<0.05$), while there was no apparent change within the kidney. The results indicate that tiger frogs are sensitive to low temperatures and that cold shock might lead to greater oxidative stress, more requirements for antioxidants and produce immunosuppression in tiger frogs. Consequently, low temperature stress will stimulate organism endocrine disorder and subject the frogs to a more intensive disturbance of physiological function, increase the survival pressure and susceptibility to infectious disease, which may affect development and dynamics of amphibian populations.

Key Words: *Hoplobatrachus rugulosus*; cold stress; cold shock; immunity; antioxidant

全球气候变化是当今人类公认的导致世界范围内两栖类动物种群衰退和灭绝的重要因素之一[1-3]。两栖类作为典型的、由水生向陆生过渡的变温动物类群,环境中稳定和有规律的气温和降水条件对其生存起着至关重要的作用[4]。由于气候异常使得极端天气的出现变得日趋频繁,非季节性的、短期且剧烈的气温变化可能会严重影响两栖类动物机体的生理机能,并能从多种途径增加其感染疾病的风险,最终影响种群的生存与稳定[5-6]。

由于生境破坏和人类的滥捕等因素,中国虎纹蛙(*Hoplobatrachus rugulosus*)野生种群濒临灭绝,已被列入中国濒危动物红皮书,是我国二级保护动物。虎纹蛙分布于热带和亚热带地区,该物种通常选择温暖潮湿的生境,对温度变化较为敏感。近年来我国南方已经开展虎纹蛙的人工驯养,但在养殖实践中发现该蛙耐寒性较差,尤其在气温波动幅度较大的季节交替期,患病率和死亡率均较高,严重制约了该产业的发展,急需相关的技术资料。为此,本研究监测了浙江省金华市南山野生虎纹蛙分布区冬季的环境气温,在实验室条件下研究了虎纹蛙在短期梯度降温和急性冷暴露(即冷休克)下的生存力及冷休克对机体免疫功能和抗氧化能力的影响。研究结果可为探讨全球气候变化导致两栖类种群衰退的机制提供理论依据,并为该蛙的人工养殖提供技术支持。

1　材料与方法

1.1　越冬期生境温度监测

利用温度记录仪(RC-20, 上海精创公司)于2009年12月1日至2010年3月31日对浙江金华南山虎纹蛙分布区进行环境温度监测。通过程序设置,将温度记录仪监测的时间间隔设为1次/h。温度探头置于较浅的洞穴内(距洞口约10 cm处),以免阳光直射和雨水浸泡。

1.2 动物与驯化

由于虎纹蛙属于国家二级保护动物,本研究所用虎纹蛙均选自浙江省金华市某虎纹蛙养殖场。将蛙饲养于水族箱(90 cm × 40 cm × 40 cm, 20 只/缸)内,提供较充足的水陆环境和遮蔽物,控制水温(22±1) ℃,光周期为 12 L∶12 D,每日以黄粉虫(*Tenebrio molitor*)活体作为饵料投食 1 次,隔日用经曝气脱氯的自来水换水 1/3,驯化时间为 1 周。

1.3 梯度降温实验

选择 100 只体重相近、体表无伤的健康虎纹蛙(75.77±1.66) g 随机分配至 4 个玻璃槽内(30 cm×20 cm×15 cm,保持 1 cm 水位),然后置入可精确控温的低温恒温培养箱(MIR-253, SANYO, Japan)内。培养箱起始温度设定为(22±0.5) ℃,通过编程设置降温速率为 2 ℃/24 h,每 24 h 记录死亡个体数,计算累积死亡率。

1.4 冷休克实验

将 60 只虎纹蛙随机分配至 3 个玻璃槽内,置入低温恒温培养箱,箱内温度预降至(2±0.5) ℃,其它条件同上。在第 2、4、6、12、24 小时记录存活情况,计算累积死亡率。

另取 30 只虎纹蛙随机分为两组,分别置于两台低温恒温培养箱内。其中,对照组设为 22 ℃,处理组设为 2 ℃。冷休克 6 h(接近半数致死时间)后,每组取 6 只蛙用于免疫和抗氧化指标分析。

1.5 免疫指标的测定

1.5.1 血细胞吞噬

蛙经毁髓后,断头取血,用 EDTA-2Na 抗凝,采用荧光标记法测定蛙全血吞噬能力,吞噬原为经荧光标记酵母(*Saccaromyces cerevisiae*),参考 Miliukiené 等[7]方法。

1.5.2 脾巨噬细胞呼吸爆发

采用氮蓝四唑(Bitroblue tetrazolium, NBT)还原法测定蛙脾脏巨噬细胞的呼吸爆发,参照 Couso 等[8]建立的方法。

1.5.3 胃溶菌酶活力

采用比浊法测定蛙胃溶菌酶活力,以溶壁微球菌(*Micrcoccus lysoleikticus*)为底物,参考 Shugar[9]的方法进行。

1.6 氧化指标的测定

蛙肝脏和肾脏用于测定脂质过氧化产物丙二醛(Malonaldehyde, MDA)、抗氧化物谷胱甘肽(Glutathione, GSH)含量以及超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)活力,测定方法详见试剂盒说明书(南京建成生物技术研究所)。

1.7 数据分析

实验数据采用统计软件 SPSS17.0 进行统计分析。免疫和抗氧化指标相关数据进行 Kolmogorov-Smirnov 正态分布检验,符合正态进行独立样本 t 检验(Independent-sample T-test);死亡率与环境温度、冷休克时间相关分析采用 Pearson 分析,回归分析采用 Curve Estimation 分析。实验结果以平均值±标准误(Mean±SE)表示,当 $P<0.05$ 时表示组间差异显著,当 $P<0.01$ 时表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 越冬期环境温度监测

监测数据分析显示,浙江省金华市南山虎纹蛙自然分布区内冬季温度范围普遍在 0—14 ℃之间波动,偶尔会降至 0 ℃以下,其越冬期间的主要低温区间在 0—4 ℃,主要高温区间在 10—14 ℃(图 1)。

2.2 梯度降温与低温耐受力

当温度降至 14 ℃时未发现有虎纹蛙死亡,降至 12 ℃以下时虎纹蛙死亡率急剧上升。12 ℃累积死亡率约为 28.1%,10 ℃为 87.5%,8 ℃为 100%。在一定温度范围内,虎纹蛙死亡率与环境温度呈显著负相关(Pearson test, $r=-0.952$, $P<0.05$),经曲线拟合,通过回归方程计算可得半数致死温度为 11.5 ℃(图 2)。

2.3　冷休克与低温耐受力

在 2 ℃冷休克 4 h 内无死亡现象,但 4 h 以后死亡率急剧增加,6 h 时死亡率为 45%,12 h 为 80%,至 24 h 时虎纹蛙全部死亡。虎纹蛙死亡率与冷休克时间呈显著正相关(Pearson test, r = 0.91, P<0.05),经曲线拟合,通过回归方程计算可得半数致死时间为 7.6 h(图 3)。

2.4　冷休克对非特异性免疫指标的影响

如表 1 所示,处理组(2 ℃, 6 h)脾巨噬细胞呼吸爆发(NBT 反应)强度(t=3.827, df=6, P<0.05)、胃溶菌酶活力(t=6.37, df=6, P<0.05)、血细胞吞噬能力(t=5.388, df=3.037, P<0.05)均显著低于对照组(表 1),说明冷休克导致机体的免疫抑制。

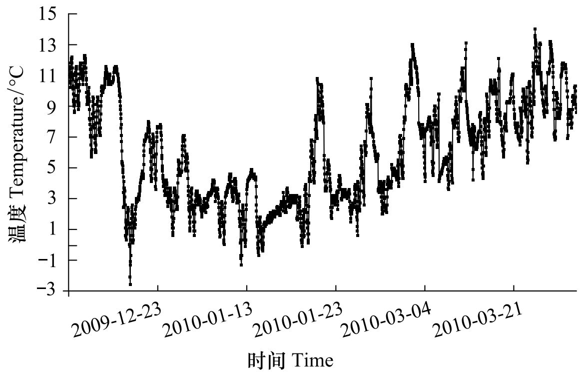

图 1　浙江金华市南山野生虎纹蛙(*Hoplobatrachus rugulosu*)分布区越冬期环境温度变化

Fig. 1　Changes of surviving environmental temperature of *Hoplobatrachus rugulosu* during overwintering period in the Southern Mountain of Jinhua in Zhejiang Province

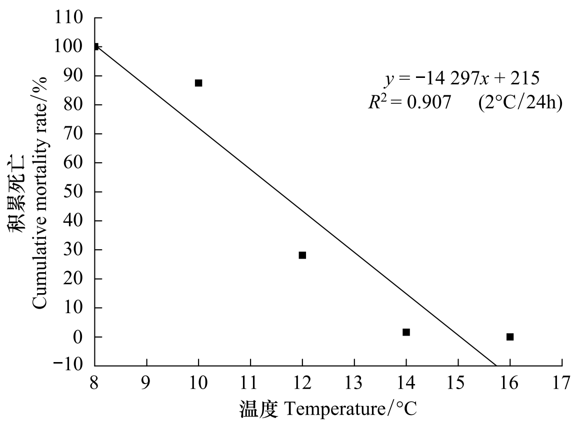

图 2　梯度降温过程中虎纹蛙的累积死亡率

Fig. 2　Cumulative mortality rate in *Hoplobatrachus rugulosus* during gradient cooling

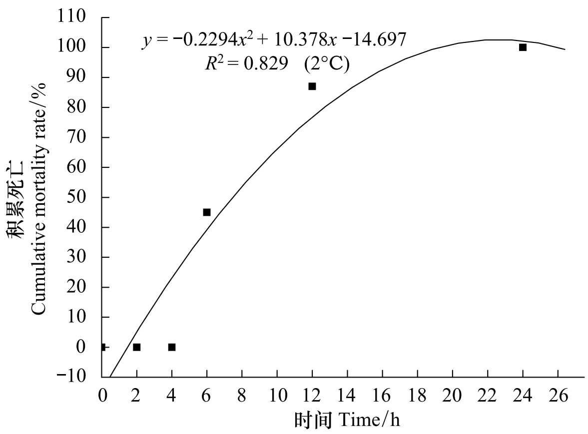

图 3　冷休克期间虎纹蛙的累积死亡率

Fig. 3　Cumulative mortality rate in *Hoplobatrachus rugulosus* during cold shock

表 1　冷休克对虎纹蛙(*Hoplobatrachus rugulosus*)非特异性免疫的影响

Table 1　The effect of cold shock on non-specific immunity in *Hoplobatrachus rugulosus*

组别 Groups	NBT 反应强度 NBT response intensity/OD_{600nm}	吞噬能力 Phagocytic activity/a. u.	溶菌酶活力 Lysozyme activity/(μg/g)
对照组 Control	0.956 ± 0.024	14.898 ± 2.31	43.270 ± 0.901
处理组 Treatment	0.623 ± 0.084 **	2.415 ± 0.316 **	34.576 ± 1.025 **

平均值以 Mean±SE 表示, * * 表示显著水平为 0.01, n=4—6

2.5　冷休克对氧化压力参数及抗氧化指标的影响

冷休克 6 h 后虎纹蛙肝脏(t=0.773, df=8, P > 0.05)和肾脏(t=0.164, df=4.542, P > 0.05)组织脂质过氧化物 MDA 含量与对照组无明显差异(图 4);而肝脏中抗氧化酶 SOD 的活性显著升高(t=−3.3,df=6,P<0.05),但肾脏中 SOD 活力无明显变化(t= 1.708, df=8, P > 0.05)(图 5);肝脏(t=−2.817, df=6, P<0.05)和肾脏(t=−11.302, df= 6, P<0.05)抗氧化物质 GSH 含量均显著增加(图 6)。结果表明冷休克(2 ℃, 6 h)能够诱导机体对抗氧化物质需求的增加。

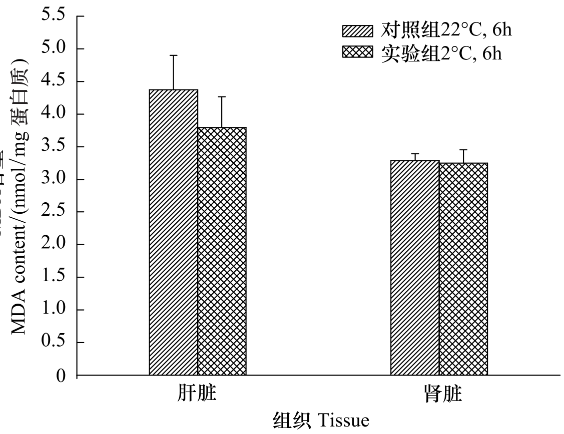

图4 冷休克对虎纹蛙肝脏和肾脏丙二醛(MDA)含量的影响

Fig. 4 The effect of cold shock on malonaldehyde (MDA) content in liver and kidney of *Hoplobatrachus rugulosus*

平均值以 Mean±SE 表示,n=4—6

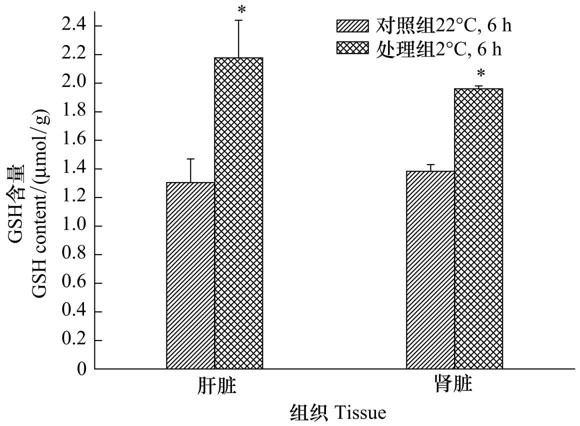

图5 冷休克对虎纹蛙肝脏和肾脏谷胱甘肽(GSH)含量的影响

Fig. 5 The effect of cold shock on glutathione (GSH) content in liver and kidney of *Hoplobatrachus rugulosus*

平均值以 Mean±SE 表示,* 表示显著水平为 0.05,n=4—6

3 讨论

全球气候变化导致极端天气的出现变得日趋频繁,非季节性的、短期且剧烈的气温变化如入冬前环境温度大幅波动可能会严重干扰两栖类动物种群的生存与稳定[1-6]。然而,国外相关研究主要集中于野外种群调查和病原生物调查[10-11],并结合气候数据进行模型预测和分析[12],从而得出气候异常与两栖类生存现状的相关规律和假说,而缺乏在实验室条件下模拟气候变化导致的气温极端变化对两栖类生理影响的相关证据。本研究为了解野生虎纹蛙在自然条件下可能遭遇的冷害程度,通过对浙江金华地区虎纹蛙分布区环境温度的监测(图1),可以看出在监测期内冬季高温区间在 10—14 ℃,低温区间主要在 0—4 ℃。根据有关文献的初步报道,虎纹蛙成蛙的适宜生长温度范围为 22—28 ℃,温度低于 12 ℃时停止摄食开始冬眠,温度低于 4 ℃易引起死亡[13]。本研究通过梯度降温实验发现,在一定温度范围内,虎纹蛙死亡率与环境温度呈显著负相关,表明环境温度变化会严重影响虎纹蛙存活率。通过回归方程计算,11.5 ℃是虎纹蛙半数致死温度,可推测该温度可能是虎纹蛙在非冬眠状态下的低温耐受临界点。本研究在野生虎纹蛙可能遭遇的低温区间内选择了 2 ℃进行冷休克实验,发现死亡率随冷休克时间延长而增加,在第 7.6 h 虎纹蛙出现半数致死。这些结果说明虎纹蛙对环境温度较为敏感,反映出热带和亚热带物种抗寒性较差的特征,但缺乏其它两栖类相关研究结果与之比较。入冬前环境温度大幅下降可能会严重降低虎纹蛙的存活率。

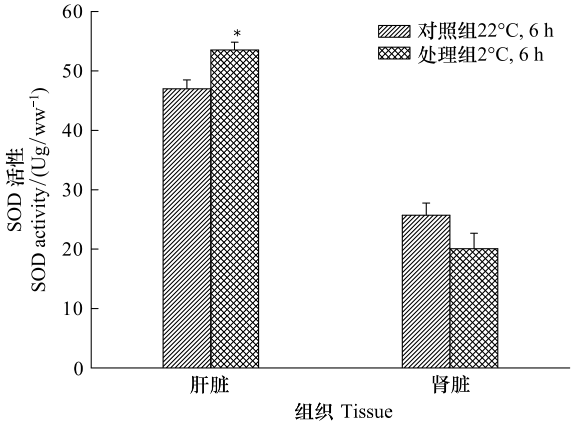

图6 冷休克对虎纹蛙肝脏和肾脏超氧化物岐化酶(SOD)活性的影响

Fig. 6 The effect of cold shock on Superoxide dismutase (SOD) content in liver and kidney of *Hoplobatrachus rugulosus*

平均值以 Mean±SE 表示,* 表示显著水平为 0.05,n=4—6

低等脊椎动的非特异性免疫在免疫防御方面的作用比特异性免疫更为广泛和重要[14-15],尤其在低温环境下非特异性免疫占有主导地位[16],然而非特异性免疫同样具有明显的温度依赖性[17-19],如虹鳟(*Oncorhynchus mykiss* L.)白细胞数目和头肾吞噬细胞呼吸爆发强度有显著的季节性变化,在冬季均降至最低[17]。Nikoskelainen 等[20]也发现低温能够降低虹鳟全血呼吸爆发强度。罗非鱼(*Oreochromis aureus*)在遭受

冷刺激(12 ℃)后,其白细胞吞噬能力显著下降[21]。中国林蛙(*Rana temporaria*)全血吞噬能力会随环境温度降低而降低[22]。豹蛙(*Rana pipiens*)在低温暴露(5 ℃)后其淋巴细胞和白细胞数目显著减少[23]。本研究发现虎纹蛙在冷休克后呼吸爆发强度和全血吞噬能力也均下降。溶菌酶作为一种广谱抗菌作用的酶类,其活力具有明显的温度依赖特征,如凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)、虹鳟、大西洋大比目鱼(*Hippoglossus hippoglossus* L.)溶菌酶活力在低温下均受到抑制,本研究结果与这些研究报道一致[17, 24-25]。此外,低温胁迫能够诱导动物体神经内分泌系统产生应激反应[26],动物体通过丘脑-垂体-肾间组织轴(Hypothalamus-pituitary-interrenal axis, HPI)分泌一系列应激激素包括儿茶酚胺、皮质类固醇等,进而抑制机体免疫和代谢等生理功能[21, 27-30]。因此,可以推测非季节性低温胁迫可能能够破坏虎纹蛙机体的内稳态并诱导免疫抑制,导致机体对病原生物敏感性的增加,加大种群的生存压力。

低温胁迫能够诱导机体产生过多的活性氧(Reactive oxygen species, ROS),改变细胞的氧化还原状态,从而打破机体抗氧化系统的平衡。有研究表明,应激激素能够增加肝脏细胞色素 P450 依赖复合功能氧化酶系统的活力[31], 而该系统是 ROS 产生的主要来源。在哺乳类研究中发现,大鼠遭受低温刺激后组织脂质过氧化产物 MDA 的显著升高[32],小白鼠在低水温环境游泳会导致肝脏 MDA 含量显著增加[33]。在低等脊椎动物中,北海绵鳚(*Zoarces viviparus*)在 5 ℃下冷刺激 2 h 后其 MDA 含量也有所增加[34]。然而,树蛙(*Rana sylvatica*)经过冷冻后组织 MDA 含量却无明显变化[35],本研究的结果与此类似,说明不同低温胁迫方式可能会导致不同的结果,或不同物种间存在反应差异。另外,低温胁迫能够诱导皮质类固醇的升高,该类激素会刺激抗氧化物质的产生[36]。如大鼠受到冷刺激后肾脏和肝脏 SOD 活性明显增强[32]。Katja 等[34]对北海绵鳚进行 1 ℃急性冷刺激也发现其肝脏抗氧化酶 SOD 活性显著增加。在本研究中,虎纹蛙肝脏 SOD 活力在冷休克后显著增加,而肾脏却无显著变化。这可能是由于肝脏含有大量内质网,而内质网微粒体上的 NADPH-细胞色素 P450 酶系统是细胞脂质过氧化物质产生的主要来源[37],因此肝脏需要产生足够 SOD 用于抗氧化。GSH 是清除氧自由基重要的非酶抗氧化物质,本研究表明冷休克增加了虎纹蛙肝脏和肾脏 GSH 含量,这与北海绵鳚[34]的研究相一致。但是,哺乳类如多纹黄鼠(*Spermophilus tridecemlineatus*)在冬眠期间肠粘膜 GSH 含量降低,且 GSH 还原酶活性降低了 50%[38];又如大鼠在遭受冷胁迫后其肝脏 GSH 总含量也明显降低[32, 39]。这些结果说明鱼类和两栖类等低等脊椎动物存在区别于哺乳动物的应对低温胁迫的应答调节机制,或拥有更具低温适应性的非酶抗氧化系统来保护细胞或组织免受低温损伤[40],有待进一步研究。

综上所述,虎纹蛙对温度变化较为敏感,耐寒能力差,低温胁迫能诱导机体产生免疫抑制并加大对抗氧化物质的需求。因而,全球气候变化引起的局部天气条件的剧烈变动可能会增加其生存压力和疾病感染的风险,最终可能影响虎纹蛙野生种群的发展与稳定。另外,虎纹蛙人工养殖在温度剧烈变化期需注意防寒,保持环境清洁,以防止疾病爆发。

致谢:感谢美国东 Ronald W Dudek 教授、英国 Chris Reading 博士、周显青教授和郑荣泉教授对本文写作的帮助。

References:

[1] Beebee T J C. Amphibian breeding and climate. Nature, 1995, 374(6519): 219-220.

[2] Daszak P, Scott D E, Kilpatrick A M, Faggioni C, Gibbons J W, Porter D. Amphibian population declines at Savannah River site are linked to climate, not chytridiomycosis. Ecology,2005, 86(12): 3232-3237.

[3] Rohr J R, Madison D M. Dryness increases predation risk in efts: support for an amphibian decline hypothesis. Oecologia, 2003, 135(4): 657-664.

[4] Pounds J A, Crump M L. Amphibian declines and climate disturbance:the case of the Golden Toad and the Harlequin Frog. Conservation Biology, 1994, 8(1): 72-85.

[5] Woolbright L L. The impact of Hurricane Hugo on forest frogs in Puerto Rico. Biotropica, 1991, 23(4): 462-467.

[6] Reading C J. Linking global warming to amphibian declines through its effects on female body condition and survivorship. Oecologia, 2007, 151(1): 125-131.

[7] Miliukienė V V, Biziulevičienė G J, Khaustova L P, Pilinkienė A V, Biziulevičius G A. Determination of quantitative parameters of *Escherichia coli phagocytosis by mouse peritoneal macrophages*. *Cell and Tissue Biology*, 2007, 1(5): 446-450.

[8] Couso N, Castro R, Magariños B, Obach A, Lamas J. Effect of oral administration of glucans on the resistance of gilthead seabream to pasteurellosis. Aquaculture, 2003, 219(1/4): 99-109.

[9] Shugar D. The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme. Biochemic and Biophysical Research Communications,1952, 8(3): 302-309.

[10] Laurance W F. Global warming and amphibian extinctions in eastern Australia. Austral Ecology, 2008, 33(1): 1-9.

[11] Lips K R, Green D E, Papendick R. Chytridiomycosis in wild frogs from Southern Costa Rica. Journal of Herpetology, 2003, 37(1): 215-218.

[12] Rohr J R, Raffel T R. Linking global climate and temperature variability to widespread amphibian declines putatively caused by disease. Proceedings of the National Academy of Sciences (U. S. A.). 2010, 107(18): 8269-8274.

[13] Chen W M. Artificial reproduction and breeding technique of *Hoplobatrachus rugulosus*. Fishery Modernization, 2006, (2): 28-29.

[14] Voyles J, Rosenblum E B, Berger L. Interactions between *Batrachochytrium dendrobatidis* and its amphibian hosts: a review of pathogenesis and immunity. Microbes and Infection, 2011, 13(1): 25-32.

[15] Marchalonis J, Edelman G M. Phylogenetic origins of antibody structure. Ⅱ. Immunoglobulins in the primary immune response of the bullfrog, *Rana catesbiana*. The Journal of Experimental Medicine, 1966, 124(5): 901-913.

[16] Le Morvan C, Deschaux P, Troutaud D. Effects and mechanisms of environmental temperature on carp (*Cyprinus carpio*) anti-DNP antibody response and non-specific cytotoxic cell activity: a kinetic study. Developmental and Comparative Immunology, 1996, 20(5): 331-340.

[17] Morgan A L, Thompson K D, Auchinachie N A, Migaud H. The effect of seasonality on normal haematological and innate immune parameters of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* L. Fish and Shellfish Immunology, 2008, 25(6): 791-799.

[18] Hayman J R, Bly J E, Levine R P, Lobb C J. Complement deficiencies in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) associated with temperature and seasonal mortality. Fish and Shellfish Immunology, 1992, 2(3): 183-192.

[19] Wright R K, Cooper E L. Temperature effects on ectotherm immune responses. Developmental and Comparative Immunology, 1981, 5(S1): 117-122.

[20] Nikoskelainen S, Bylund G, Lilius E M. Effect of environmental temperature on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) innate immunity. Developmental and Comparative Immunology, 2004, 28(6): 581-592.

[21] Chen W I, Suna L T, Tsai C L, Song Y L, Chang C F. Cold-stress induced the modulation of catecholamines, cortisol, immunoglobulin M, and leukocyte phagocytosis in Tilapia. General and Comparative Endocrinology, 2002, 126(1): 90-100.

[22] Marnila P, Tiiska A, Lagerspetz K, Lilius E M. Phagocyte activity in the frog *Rana temporaria*: whole blood chemiluminescence method and the effects of temperature and thermal acclimation. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, 1995, 111(4): 609-614.

[23] Maniero G D, Carey C. Changes in selected aspects of immune function in the leopard frog, *Rana pipiens*, associated with exposure to cold. Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology, 1997, 167(4): 256-263.

[24] Langston A L, Hoare R, Stefansson M, Fitzgerald R, Wergeland H, Mulcahy M. The effect of temperature on non-specific defence parameters of three strains of juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). Fish and Shellfish Immunology, 2002, 12(1): 61-76.

[25] Bowden T J, Butler R, Bricknell I R. Seasonal variation of serum lysozyme levels in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). Fish and Shellfish Immunology, 2004, 17(2): 129-135.

[26] Ader R, Felten D L, Cohen N. Phychoneuroimmunology. 2nd ed. New York: Academic Press Inc, 1991: 12-18.

[27] Bernier N J, Peter R E. The hypothalamic-pituitary-interrenal axis and the control of food intake in teleost fish. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2001, 129(2/3): 639-644.

[28] Donaldson M R, Cooke S J, Patterson D A, Macdonald J S. Cold shock and fish. Journal of Fish Biology, 2008,73(7): 1491-1530.

[29] Kozyreva T V, Eliseeva L S. Immune response in cold exposures of different types. Journal of Thermal Biology, 2000, 25(5): 401-404.

[30] Barton B A, Iwama G K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. Annual Review of Fish Diseases, 1991, 1(6): 3-26.

[31] Kato R. Drug metabolism under pathological and abnormal physiological states in animals and man. Xenobiotica, 1977, 7(1/2): 25-92.

[32] Sahin E, Gümüşlü S. Cold-stress-induced modulation of antioxidant defence: role of stressed conditions in tissue injury followed by protein oxidation and lipid peroxidation. International Journal of Biometeorology, 2004, 48(4): 165-171.

[33] Huang L Y, Xu H W. Research in the effects of swimming mice under low water temperature environment on the metabolism in free radical. Journal of Guangzhou Physical Education Institue, 1998, 18(1): 44-48.

[34] Heise K, Puntarulo S, Nikinmaa M, Lucassen M, Pörtner H O, Abele D. Oxidative stress and HIF-1 DNA binding during stressful cold exposure and recovery in the North Sea eelpout (*Zoarces viviparus*). Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology,

2006, 143(4): 494-503.

[35] Joanisse D R, Storey K B. Oxidative damage and antioxidants in *Rana sylvatica*, the freeze-tolerantwood frog. American Journal of Physiology, 1996, 271(3 Pt 2): R545-R553.

[36] Gavan N, Maibach H. Effect of topical corticosteroids on the activity of superoxide dismutase in human skin in vitro. Skin Pharmacology, 1997, 10(5/6): 309-313.

[37] Mead J F. Free radical mechanisms of lipid damage and consequences for cellular membranes//Pryor W A, ed. Free Radicals in Biology. New York: Academic Press, 1976: 51-68.

[38] Carey H V, Rhoads C A, Aw T Y. Hibernation induces glutathione redox imbalance in ground squirrel intestine. Journal of Comparative Physiology, 2003, 173(4): 269-276.

[39] Kaushik S, Kaur J. Chronic cold exposure affects the antioxidant defense system in various rat tissues. Clinica Chimica Acta, 2003, 333(1): 69-77.

[40] Gómez G D, Balcúzar J L. A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 2008, 52(2): 145-154.

参考文献:

[13] 陈为民. 虎纹蛙的人工繁殖与育苗技术. 渔业现代化, 2006,(2): 28-29.

[33] 黄丽英, 许豪文. 低水温环境对游泳小白鼠体内自由基代谢水平的影响. 广州体育学院学报,1998, 18(1): 44-48.

ACTA ECOLOGICA SINICA Vol. 32, No. 11 June, 2012 (Semimonthly)
CONTENTS

Review and Monograph

Discussion

Scientific Note

《生态学报》2012 年征订启事

《生态学报》是中国生态学学会主办的自然科学高级学术期刊,创刊于 1981 年。主要报道生态学研究原始创新性科研成果,特别欢迎能反映现代生态学发展方向的优秀综述性文章;研究简报;生态学新理论、新方法、新技术介绍;新书评介和学术、科研动态及开放实验室介绍等。

《生态学报》为半月刊,大 16 开本,280 页,国内定价 70 元/册,全年定价 1680 元。

国内邮发代号:82-7　国外邮发代号:M670　标准刊号:ISSN 1000-0933　CN 11-2031/Q

全国各地邮局均可订阅,也可直接与编辑部联系购买。欢迎广大科技工作者、科研单位、高等院校、图书馆等订阅。

通讯地址: 100085 北京海淀区双清路 18 号　**电　　话**: (010)62941099; 62843362

E-mail: shengtaixuebao@ rcees. ac. cn　**网　　址**: www. ecologica. cn

编辑部主任　孔红梅　　**执行编辑**　刘天星　段　靖

生　态　学　报
(SHENGTAI　XUEBAO)
(半月刊　1981 年 3 月创刊)
第 32 卷　第 11 期　(2012 年 6 月)

ACTA ECOLOGICA SINICA
(Semimonthly, Started in 1981)
Vol. 32　No. 11 (June, 2012)

编　　辑	《生态学报》编辑部 地址:北京海淀区双清路 18 号 邮政编码:100085 电话:(010)62941099 www. ecologica. cn shengtaixuebao@ rcees. ac. cn	**Edited** by	Editorial board of ACTA ECOLOGICA SINICA Add: 18, Shuangqing Street, Haidian, Beijing 100085, China Tel: (010)62941099 www. ecologica. cn Shengtaixuebao@ rcees. ac. cn
主　　编	冯宗炜	**Editor-in-chief**	FENG Zong-Wei
主　　管	中国科学技术协会	**Supervised** by	China Association for Science and Technology
主　　办	中国生态学学会 中国科学院生态环境研究中心 地址:北京海淀区双清路 18 号 邮政编码:100085	**Sponsored** by	Ecological Society of China Research Center for Eco-environmental Sciences, CAS Add: 18, Shuangqing Street, Haidian, Beijing 100085, China
出　　版	科学出版社 地址:北京东黄城根北街 16 号 邮政编码:1R00717	**Published** by	Science Press Add: 16 Donghuangchenggen North Street, Beijing　100717, China
印　　刷	北京北林印刷厂	**Printed** by	Beijing Bei Lin Printing House, Beijing 100083, China
发　　行	科学出版社 地址:东黄城根北街 16 号 邮政编码:100717 电话:(010)64034563 E-mail: journal@ cspg. net	**Distributed** by	Science Press Add: 16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China Tel: (010)64034563 E-mail: journal@ cspg. net
订　　购	全国各地邮局	**Domestic**	All Local Post Offices in China
国外发行	中国国际图书贸易总公司 地址:北京 399 信箱 邮政编码:100044	**Foreign**	China International Book Trading Corporation Add: P. O. Box 399 Beijing 100044, China
广告经营 许 可 证	京海工商广字第 8013 号		

ISSN 1000-0933
CN 11-2031/Q　　**国内外公开发行**　　**国内邮发代号** 82-7　　**国外发行代号** M670　　**定价** 70.00 元