

不同水平内源警戒素对斑马鱼恐惧行为影响的性别差异*

谭美灵, 李英文, 陈启亮, 沈彦君, 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】探究不同水平内源警戒素(Alarm substance, AS)对斑马鱼(*Danio rerio*)恐惧行为影响的性别差异及诱导雌、雄斑马鱼产生恐惧反应的最低AS水平。【方法】采用以斑马鱼表皮质量浓度计分别为0(对照), 0.2, 0.4, 0.8, 2.0, 3.0和4.0 mg·L⁻¹的不同水平AS对雌、雄斑马鱼进行恐惧行为测试并分析有关行为学指标。【结果】1)当AS水平在0~0.8 mg·L⁻¹范围内逐渐上升时,雌、雄斑马鱼的首次上浮时间和底层停留总时间有逐渐延长的趋势。2)与对照组相比,当AS水平为0.2 mg·L⁻¹时雌性斑马鱼首次上浮时间、底层停留总时间有统计学意义上的延长($p < 0.05$),而当AS水平为0.8 mg·L⁻¹时雄性斑马鱼首次上浮时间、底层停留总时间有统计学意义上的延长($p < 0.05$);3)当AS水平为0.8, 2.0, 3.0和4.0 mg·L⁻¹时雌性斑马鱼首次上浮时间有长于雄性斑马鱼首次上浮时间的趋势,当AS水平为0.2, 0.4, 3.0和4.0 mg·L⁻¹时雌性斑马鱼底层停留总时间有长于雄性斑马鱼底层停留总时间的趋势,但有关差异无统计学意义。【结论】在一定AS水平范围内,斑马鱼的恐惧反应程度与AS水平有呈正相关关系的趋势。雌性斑马鱼与雄性斑马鱼相比有更易产生恐惧行为的趋势;在受同一水平AS刺激后,雌性斑马鱼的恐惧行为较雄性斑马鱼而言有加强的趋势。上述恐惧行为的性别差异可能与雌、雄斑马鱼体内激素水平和神经系统的警觉水平有密切关系。

关键词:斑马鱼;恐惧行为;警戒素;性别

中图分类号:Q492.5

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2022)03-0053-06

动物能通过化学、物理、行为等各种信息的传递进行交流,这些信息的传递能帮助动物有效识别异性或躲避天敌,有利于动物的生存和繁衍^[1]。例如,金乌贼(*Sepia esculenta*)雄性在繁殖期选择异性时,利用变得鲜亮的体色吸引雌性,并对竞争者起警示作用^[2]。然而,某些鱼类的眼高度退化且部分水环境的透明度较低,此时物理信息和行为信息传递受限,因此化学信息传递就成为鱼类重要的交流方式^[3]。当接收到各种有效化学信息时,鱼类能通过改变自身行为以应对不断变换的环境。例如,当硬骨鱼类因受到攻击而表皮受损时,表皮棒状细胞会分泌化学预警信息即内源警戒素(Alarm substances, AS),由此引起同类的恐惧反应和报警行为^[4-5]。目前AS的有效化学成分尚不清楚,但已有研究表明次黄嘌呤3-N-氧化物及软骨素能有效激发鱼类的恐惧反应^[6-7]。

恐惧反应是动物面对即时危险刺激时产生的一种生理状态和一系列行为变化,在行为上表现为冻结或逃避。由于鱼类的生存环境较为特殊,因此鱼类恐惧行为主要表现为出现冻结反应、探索行为减少、底层停留时间延长等^[8]。适当的恐惧反应能提高动物的警觉水平,使之躲避外界伤害,但过强或过弱的恐惧反应都不利于个体生存及种族延续^[9]。随着人类社会的发展,大量鱼类栖息地遭受光污染、噪声等人为因子破坏;而生境的变化将改变鱼类的恐惧响应。例如,短光周期可抑制雄性斑马鱼(*Danio rerio*)的恐惧反应^[10]。为减少人为因素对鱼类恐惧反应的不利影响,有关鱼类恐惧反应的影响因素研究正日益增多。目前实验室通常使用鱼类皮肤提取物作为报警物质,并以此诱导同种鱼类的恐惧反应。研究表明:斑马鱼的恐惧反应与同类的皮肤提取物使用量呈正相关关系;且皮肤提取物使用量过大会使实验鱼过度恐惧,使用量过低则不足以引起实验鱼的恐惧反应^[11]。因此,AS水平的选择对于开展鱼类恐惧行为实验至关重要。此外有研究发现,斯氏鼯鼠(*Eospalax smithii*)的恐惧行为存在性别差异,在同等危险刺激下雄鼠表现得更加勇敢^[12]。然而,有关在同一水平AS影响下雌、雄鱼类的恐惧行为是否有性别差异以及引起雌、雄鱼类恐惧行为的最低AS水平是否一致的研究还鲜有报道。

* 收稿日期:2021-09-22 修回日期:2021-10-04 网络出版时间:2022-05-17 09:36

资助项目:国家自然科学基金青年项目(No. 31901183);重庆市自然科学基金(No. cstc2020jcyj-msxmX0805);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. KJ1600308)

第一作者简介:谭美灵,女,研究方向为鱼类生理学,E-mail:tanmeiling0414@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:https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20220516.1543.008.html

斑马鱼是一种原产于南亚国家的鲤科(Cyprinidae)小型淡水热带鱼类,是生命科学研究常用的模式动物之一^[13]。基于上述研究背景,本研究用斑马鱼表皮制成不同水平 AS,以此对雌、雄斑马鱼进行恐惧行为测试,分析雌、雄斑马鱼的行为指标,探讨不同水平 AS 刺激对斑马鱼恐惧行为的影响及诱导雌、雄斑马鱼产生恐惧反应的最低 AS 水平。本研究旨在为实验室条件下利用 AS 诱导鲤科鱼类恐惧行为提供新的技术参考,同时也为后续有关探究鱼类恐惧反应的影响因素以及扩展 AS 的应用研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料与处理

从国家斑马鱼资源中心购得(AB系,180日龄)斑马鱼雌鱼42尾、雄鱼55尾,平均体质量为 (0.42 ± 0.05) g。在实验前将实验鱼分别置于恒温系统中驯养14 d,水温为 (28 ± 0.5) °C,光照时间为9:00—21:00,水体溶氧量测定为 $5.88 \sim 6.50$ mg · L⁻¹,每日9:00,15:00和21:00各喂食1次,每次投喂饲料质量占斑马鱼体质量的2%,驯养期间每3日彻底更换驯养水体1次。

1.2 恐惧行为测试

过去在实验室条件下通常取同种或近源鱼类的表皮来制备 AS,且多采用单位面积鱼皮进行匀浆或划破活鱼的表皮再浸泡清水的方法^[11]。考虑到斑马鱼的体型及动物福利的问题,故本研究在实验当天使用 MS-222 麻醉剂将斑马鱼执行安乐死后,立刻取表皮并称得表皮质量^[14]以制备研究所需的 AS 溶液。具体操作方法为:取同期生长的雄性斑马鱼13尾,使用 225 mg · L⁻¹的 MS-222 溶液对它们执行安乐死并用清水冲洗鱼体,然后取下表皮,将表皮与双蒸水以 40 mg : 1 mL 的比例混合,充分匀浆后取上清液,再加入相应体积的双蒸水,配制成以斑马鱼表皮质量浓度计分别为 $1, 2, 4, 10, 15$ 和 20 mg · mL⁻¹的不同水平 AS 溶液,于 4 °C条件下保存备用。

在正式实验时同时使用14个规格为 25 cm × 20 cm × 30 cm 的测试鱼缸。为避免外界环境影响,除拍摄面以外,其他缸面内壁均贴上白色防水纸以尽可能减少外界环境影响。在测试缸中加入 5 L 脱氯自来水,并在水位中线处划线以区分上、下层水体。将日本索尼公司生产的 SONY DSC-RX100 M4 型摄像机的摄像头固定于测试缸拍摄面正前方 50 cm 处。将雌、雄实验鱼各分为7个处理组,每组6尾鱼进行恐惧行为测试。将测试鱼轻柔地放进测试缸中并适应 10 min。适应结束后,在各组测试缸水面中心分别缓慢加入上述不同水平的 AS 溶液 1 mL,此时测试缸内的 AS 水平分别为 $0.2, 0.4, 0.8, 2.0, 3.0$ 和 4.0 mg · L⁻¹;对照组则加入 1 mL 双蒸水代替 AS 溶液;然后拍摄视频 20 min。在进行下一次拍摄前彻底清洗测试鱼缸,然后依次完成所有处理组的恐惧行为测试。参照文献^[15],对所拍摄的视频进行以下行为学指标分析:1) 首次上浮时间,即实验鱼首次从下层水体跨越中线进入上层水体的时间;2) 底层停留总时间,即 20 min 内实验鱼在下层水体活动的总时间。

1.3 数据处理

实验数据用“平均值±标准误”来表示。用 SPSS 13.0 软件对实验数据进行独立样本 t 检验,当 $p < 0.05$ 时, t 检验结果具有统计学意义。使用 Prism 6 软件绘制柱形图。

2 结果

2.1 对首次上浮时间的影响

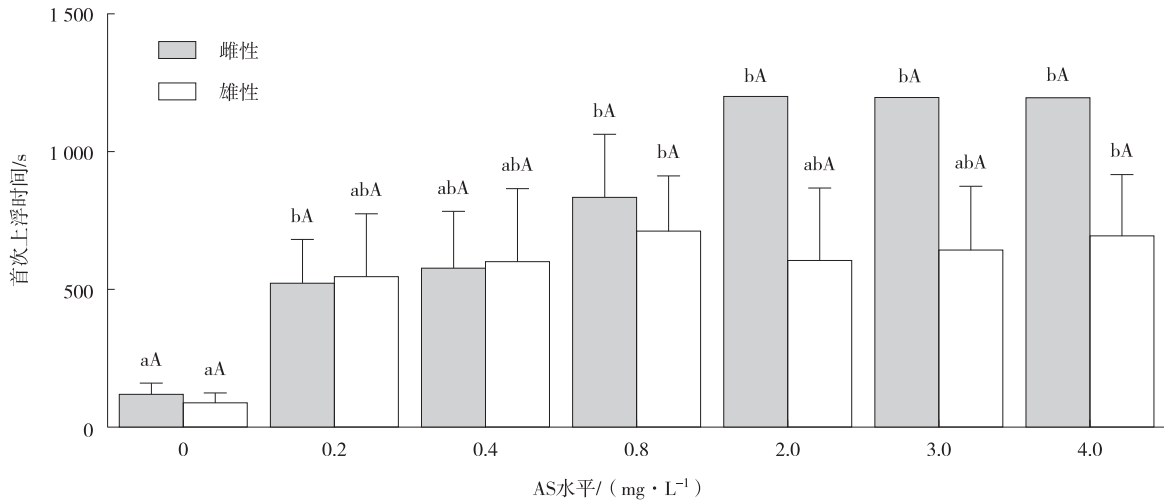
图1显示:与雌性对照组相比,雌性斑马鱼在受到 $0.2, 0.8, 2.0, 3.0$ 和 4.0 mg · L⁻¹的不同水平 AS 溶液刺激后,首次上浮时间均有统计学意义的延长($p < 0.05$)。与雄性对照组相比,在受到 0.8 和 4.0 mg · L⁻¹的不同水平 AS 刺激后,雄性斑马鱼首次上浮时间点有统计学意义上的延长($p < 0.05$)。在 AS 水平为 $0.2 \sim 0.8$ mg · L⁻¹范围内,雌、雄斑马鱼首次上浮时间呈剂量依赖性延长趋势。

2.2 对底层停留总时间的影响

从图2可知:与雌性对照组相比,在受到 $0.2, 0.4, 2.0, 3.0$ 和 4.0 mg · L⁻¹的不同水平 AS 刺激后,雌性斑马鱼底层停留总时间有统计学意义上的延长($p < 0.05$)。与雄性对照组相比,在受到 $0.8, 2.0, 3.0$ 和 4.0 mg · L⁻¹的不同水平 AS 刺激后,雄性斑马鱼底层停留总时间有统计学意义上的延长($p < 0.05$)。在 AS 水平为 $0.2 \sim 0.8$ mg · L⁻¹范围内,雄性斑马鱼底层停留总时间呈剂量依赖性延长趋势。

2.3 对斑马鱼恐惧行为影响的性别差异

在受到 $0\sim 4.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的不同水平 AS 刺激后,雌性斑马鱼与雄性斑马鱼的首次上浮时间差异无统计学意义,但在受到 $0.8, 2.0, 3.0, 4.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的不同水平 AS 刺激后,雌性斑马鱼首次上浮时间有长于雄性斑马鱼首次上浮时间的趋势(图 1)。同时,在受到 $0.2, 0.4, 3.0$ 和 $4.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的不同水平 AS 刺激后,雌性斑马鱼底层停留总时间有略长于雄性斑马鱼底层停留总时间的趋势,但两者在 $0\sim 4.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 AS 水平范围内无统计学意义上的差异(图 2)。



注:不同小写字母表示同一性别斑马鱼的不同处理组($n=6$)数据差异具有统计学意义($p<0.05$),相同大写字母表示同一水平 AS 刺激下雌、雄斑马鱼的有关行为学指标数据差异无统计学意义;AS 水平以雄斑马鱼的表皮质量浓度计;下同

图 1 不同水平 AS 对雌、雄斑马鱼首次上浮时间的影响

Fig. 1 The effect of different levels of endogenous alarm substance on the onset time to the higher half of female and male zebrafish

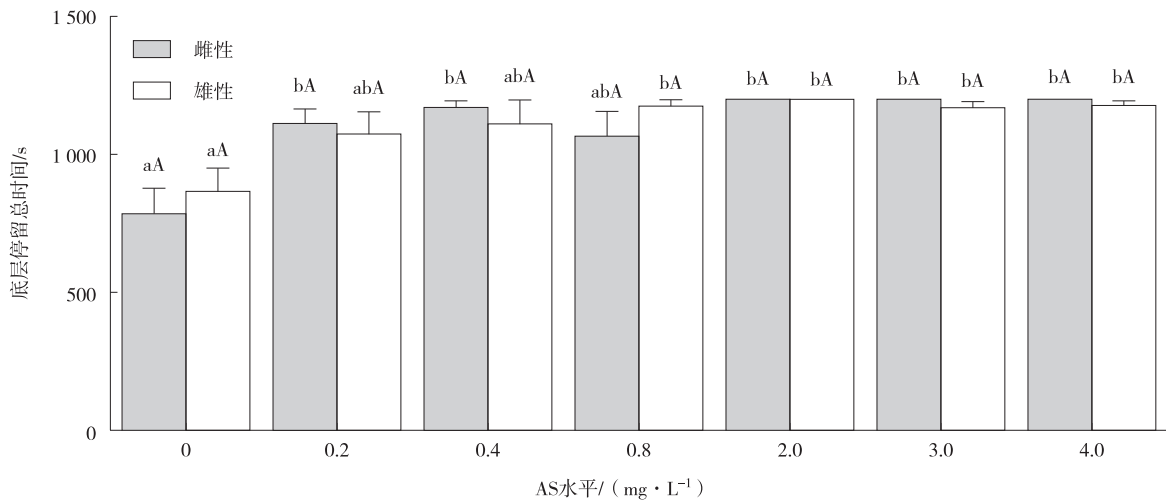


图 2 不同水平 AS 对雌、雄斑马鱼底层停留总时间的影响

Fig. 2 The effect of different levels of endogenous alarm substance on the total duration spent in the lower half of female and male zebrafish

3 讨论与结论

鱼类在受到攻击且表皮受损时会释放 AS。AS 被周围鱼类识别后,会刺激它们并使之表现出恐惧行为,且进一步被更多同类通过视觉或侧线所感知,从而形成快速、有效的信号机制以有效应对捕食者的侵害,有利于种族的延续。鱼类的恐惧反应在行为上一般表现为探索行为减少、停留在底层水域时间延长或发生冻结反应。当恐惧反应得到缓解或解除时,它们的探索行为会明显增多。因此,首次上浮时间及底层停留总时间的延长可以

表现鱼类的恐惧行为有加强的趋势^[8]。

在本研究中,当 AS 水平在 $0.2\sim 0.8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内逐渐递增时,雌、雄斑马鱼的恐惧行为均有逐渐加强的趋势。这一趋势与 Speedie 等人^[11]的研究结果一致。与对照组相比,在受到 $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 AS 刺激后,雌性斑马鱼的首次上浮时间及底层停留总时间均有统计学意义上的延长($p<0.05$),而雄性斑马鱼的上述指标无统计学意义上的变化。该结果表明较低水平的 AS 即可引起雌性斑马鱼的恐惧反应。与之相对应的是,在受到 $0.8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 AS 刺激后,雄性斑马鱼首次上浮时间及底层停留总时间与对照组相比才均有统计学意义上的延长($p<0.05$)。由此可见,相对于雄性斑马鱼而言,引起雌性斑马鱼恐惧反应的 AS 水平更低。因此,与雄性斑马鱼相比,雌性斑马鱼更容易出现恐惧反应。

动物的行为变化与内分泌水平和神经系统的警觉水平息息相关。有研究发现,硬骨鱼类焦虑和恐惧反应的加剧通常伴随着血浆中皮质醇水平的上升^[15-16]。另一方面,五羟色胺(Serotonin, 5-HT)在鱼类对外界应答过程中也起着重要作用,当鱼类感知危险时,体内 5-HT 水平降低,从而使鱼类的探索行为减少,并使之产生恐惧反应^[17-18]。此外,多巴胺(Dopamine, DA)和 5-HT 水平降低时,动物的恐惧反应也会加剧^[19-20]。上述研究发现,皮质醇水平可能与鱼类恐惧反应程度呈正相关关系,而 5-HT 和 DA 的水平则与鱼类恐惧反应强度呈负相关关系。还有研究表明,相对于雄性斑马鱼,雌性斑马鱼血浆中皮质醇水平略高^[21-22],且后者脑中 DA 和 5-HT 水平也较低^[23-24]。因此,本研究结果所揭示的不同性别斑马鱼恐惧反应的差异性很可能与它们血浆中皮质醇水平以及脑中 DA、5-HT 的水平差异有密切关系,值得进一步深入研究。

雌性斑马鱼相对于雄性斑马鱼更容易产生恐惧反应的事实也表明雌性斑马鱼对周围环境的警惕性高于雄性。已有研究表明,鱼类血浆中皮质醇水平与自身的警惕性高低呈正相关关系^[25]。由于雌性斑马鱼血浆中皮质醇水平高于雄性,警惕性也高于后者,因此较低水平的 AS 就足以引起雌性斑马鱼产生恐惧反应。当生境中出现捕食者等危险因素时,雌性斑马鱼能更加迅速地感应到警戒信号从而有效地躲避危险,有利于物种延续。然而,皮质醇水平过高也会影响斑马鱼的情绪调节,使之过度焦虑、恐惧甚至抑郁,不利于斑马鱼正常进行如摄食、繁殖等各项生命活动。有研究者发现在同一危险刺激下,斯氏鼯鼠的雄性个体相对于雌性个体更加勇敢且更具冒险性^[12],这与本研究得出的有关趋势基本一致。同时需要注意的是,在本研究中受到同一水平 AS 刺激后雌、雄斑马鱼与恐惧行为相关的行为学指标没有出现统计学意义上的差异,这可能与本研究的样本量偏少且所选斑马鱼的个体差异较大有关:图 1 和图 2 均显示出部分处理组的标准误较大。因此,可通过增加样本量并选择日常行为更加一致的实验鱼的方式来进一步减小研究中的误差。

值得一提的是,本研究通过称取实验鱼表皮体质量并按一定比例与双蒸水混合配制 AS 溶液的方式不仅操作简易方便,而且所需实验鱼的数量相比其他方式而言也更少^[11],值得在有关研究中加以推广。同时在今后类似的研究中也需特别注意:相对于雌性斑马鱼,在诱导雄性斑马鱼产生恐惧反应时应设置较高 AS 水平,同时 AS 水平的设置也需处于合理范围,以免实验鱼无法产生恐惧反应或者影响到有关行为学指标的比较。

综上所述,在一定 AS 水平范围内,斑马鱼的恐惧反应程度与 AS 水平有呈正相关关系的趋势;与雄性斑马鱼相比,引起雌性斑马鱼恐惧反应的 AS 水平更低;在受同一水平 AS 刺激后雌性斑马鱼较雄性斑马鱼而言恐惧反应有更加强烈的趋势。上述恐惧行为的性别差异可能与雌、雄斑马鱼体内激素水平和神经系统的警觉水平有密切关系。

参考文献:

- [1] 曹小龙. 斑马鱼报警物质和色素模式对其行为影响的研究[D]. 上海:上海海洋大学,2019.
CAO X L. Effects of alarm substance and pigment patterns on behaviors of zebrafish (*Danio rerio*)[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2019.
- [2] 王亮,张秀梅,丁鹏伟,等. 金乌贼繁殖行为与交配策略[J]. 生态学报,2017,37(6):1871-1880.
WANG L, ZHANG X M, DING P W, et al. Reproductive behavior and mating strategy of *Sepia esculenta*[J]. Acta Ecologica Sinica, 2017, 37(6): 1871-1880.
- [3] XIA J G, CHENG M L, CAI R Y, et al. Ontogenetic changes in chemical alarm cue recognition and fast-start performance in guppies (*Poecilia reticulata*)[J]. Ethology, 2017, 123(12): 916-923.

- [4] SMITH R J F. Alarm signals in fishes[J]. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 1992, 2(1):33-63.
- [5] FRISCH K. Über einen schreckstoff der fischhaut und seine biologische bedeutung[J]. *Zeitschrift für Vergleichende Physiologie*, 1942, 29(1/2):41-51.
- [6] PARRA K V, ADRIAN J C, GERLAI R. The synthetic substance hypoxanthine 3-N-oxide elicits alarm reactions in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Behavioural Brain Research*, 2009, 205(2):336-341.
- [7] MATHURU A S, KIBAT C, CHEONG W F, et al. Chondroitin fragments are odorants that trigger fear behavior in fish[J]. *Current Biology*, 2012, 22(6):538-544.
- [8] EGAN R J, BERGNER C L, HART, P C, et al. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish[J]. *Behavioural Brain Research*, 2009, 205(1):38-44.
- [9] STEIMER T. The biology of fear- and anxiety-related behaviors[J]. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 2002, 4(3):231-249.
- [10] 刘智皓, 李庆玲, 李柯骞, 等. 不同光周期急性暴露对雄性斑马鱼攻击、焦虑和恐惧行为的干扰效应[J]. *重庆师范大学学报(自然科学版)*, 2020, 37(6):33-38.
LIU Z H, LI Q L, LI K R, et al. Acute photoperiod disturbances disrupted the aggressive, anxiety, and fear behavior of male zebrafish[J]. *Journal of Chongqing Normal University (Natural Science)*, 2020, 37(6):33-38.
- [11] SPEEDIE N, GERLAI R. Alarm substance induced behavioral responses in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Behavioural Brain Research*, 2008, 188(1):168-177.
- [12] HEGAB I M, QIAN Z, PU Q S, et al. Gender difference in unconditioned and conditioned predator fear responses in Smith's zokors (*Eospalax smithii*) [J/OL]. *Global Ecology and Conservation*, 2018, 16: e00503. [2021-09-22]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2351989418303597>
- [13] 赵丹. 急、慢性缺氧对斑马鱼幼鱼神经系统损伤机制的初步研究[D]. 广州:南方医科大学, 2014.
ZHAO D. Pilot study of mechanism of nervous system damage of zebrafish larvae caused by acute/chronic hypoxia[D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2014.
- [14] 甘静雯, 邱绍扬, 许忠能, 等. 麻醉剂 MS-222 对斑马鱼行为的影响[J]. *生态科学*, 2006, 25(2):236-239.
GAN J W, QIU S Y, XU Z N, et al. The effects of MS-222 on behavior of *Danio rerio* [J]. *Ecologic Science*, 2006, 25(2):236-239.
- [15] LIU Z H, LI Y W, HU W, et al. Mechanisms involved in tributyltin-enhanced aggressive behaviors and fear responses in male zebrafish[J/OL]. *Aquatic Toxicology*, 2020, 220:105408. [2021-09-22]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0166445X19305922>.
- [16] WENDELAAR BONGA S E. The stress response in fish[J]. *Physiological Reviews*, 1997, 77(3):591-625.
- [17] PFEIFFER W, RIEGELBAUER G. The effect of the alarm substance on the central nervous excitation of the black tetra *Gymnocorymbus ternetzi* (Characidae, Ostariophysi, Pisces) indicated by dorsal light response[J]. *Journal of Comparative Physiology*, 1978, 123(3):281-288.
- [18] MAXIMINO C, LIMA M G, COSTA C C, et al. Fluoxetine and WAY 100,635 dissociate increases in scototaxis and analgesia induced by conspecific alarm substance in zebrafish (*Danio rerio* Hamilton 1822) [J]. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 2014, 124:425-433.
- [19] HENDRICKS T J, FYODOROV D V, WEGMAN L J, et al. Pet-1 ETS gene plays a critical role in 5-HT neuron development and is required for normal anxiety-like and aggressive behavior[J]. *Neuron*, 2003, 37(2):233-247.
- [20] NATHAN F M, OGAWA S, PARHAR I S. Kisspeptin1 modulates odorant-evoked fear response via two serotonin receptor subtypes (5-HT1A and 5-HT2) in zebrafish[J]. *Journal of Neurochemistry*, 2015, 133(6):870-878.
- [21] RAMBO C L, MOCELIN R, MARCON M, et al. Gender differences in aggression and cortisol levels in zebrafish subjected to unpredictable chronic stress[J]. *Physiology & Behavior*, 171:50-54.
- [22] REOLON G K, de MELO G M, dos SANTOS da ROSA J G, et al. Sex and the housing: effects on behavior, cortisol levels and weight in zebrafish[J]. *Behavioural Brain Research*, 2018, 336:85-92.
- [23] LORENZI V, CARPENTER R E, SUMMERS C H, et al. Serotonin, social status and sex change in the bluebanded goby *Lythrypnus dalli* [J]. *Physiology & Behavior*, 2009, 97(3/4):476-483.
- [24] DAHLBOM S J, BACKSTROM T, LUNDSTEDT-ENKEL K, et al. Aggression and monoamines: effects of sex and social rank in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Behavioural Brain Research*, 2012, 228(2):333-338.
- [25] BARTON B A, IWAMA G K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids[J]. *Annual Review of Fish Diseases*, 1991, 1:3-26.

Animal Sciences

Sexual Differences in the Effect of Different Levels of Endogenous Alarm Substance on Fear Behavior of Zebrafish

TAN Meiling, LI Yingwen, CHEN Qiliang, SHEN Yanjun, 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 explore the sexual differences in the effects of different levels of endogenous alarm substance (AS) on the fear response of zebrafish (*Danio rerio*) and the minimal levels of AS inducing fear response of male and female zebrafish. [Methods] Female and male zebrafish were tested in different levels of endogenous AS at 0 (control), 0.2, 0.4, 0.8, 2.0, 3.0 and 4.0 mg · L⁻¹ respectively, and the behavioral indice were analyzed. [Findings] 1) When given the AS in the range of 0 ~ 0.8 mg · L⁻¹, the onset time to the higher half and the total duration spent in the lower half of the fish increased gradually. 2) Compared with the control, given the AS of 0.2 mg · L⁻¹, the onset time to the higher half and the total duration spent in the lower half were significantly prolonged in females ($p < 0.05$). However, when given the AS of 0.8 mg · L⁻¹, these parameters of male zebrafish were significantly prolonged ($P < 0.05$). 3) The onset time to higher half in females was delayed when compared to that of males in the range of 0.8, 2.0, 3.0, 4.0 mg · L⁻¹; and the females spent slightly but not significantly longer in the bottom than the males at 0.2, 0.4, 3.0, 4.0 mg · L⁻¹. [Conclusions] Within a certain range of AS levels, the fear response of both sexes was positively correlated with AS levels. Female fish seems to be more sensitive against AS than the male zebrafish. When stimulated by the same level of AS, the fear behavior of female zebrafish tended to be intensified than male. The above-mentioned sexual differences in fear behavior may be closely related to the cortisol levels in female and male zebrafish and the vigilance level in the nervous system.

Keywords: zebrafish; fear behavior; alarm substance; sexual

(责任编辑 方 兴)