



杨惠敏, 黄欣, 许胜杰, 等. 团头鲂对两种气味的行为响应、嗅觉电生理及嗅觉受体基因表达模式 [J]. 水产学报, 2026, 50(5): 059109.

Yang H M, Huang X, Xu S J, *et al.* Two olfactory stimuli on electrophysiological responses, behavioral patterns, and olfactory receptor gene expression in *Megalobrama amblycephala* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2026, 50(5): 059109 (in Chinese).

## 团头鲂对两种气味的行为响应、嗅觉电生理及嗅觉受体基因表达模式

杨惠敏, 黄欣\*, 许胜杰, 毕卓铃, 高泽霞, 刘寒  
(华中农业大学水产学院, 农业农村部淡水生物繁殖重点实验室, 湖北武汉 430070)

**摘要:** 【目的】探究鱼类的嗅觉在社会气味(氯化铵)和警戒气味(团头鲂血液)识别中的作用。【方法】实验借助嗅电反应和行为学研究了团头鲂对不同气味的敏感度和行为偏好性, 并采用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR) 研究了不同气味刺激后 10 个代表性嗅觉受体基因 (ORs) 在团头鲂嗅囊 (OE)、嗅球 (OB) 和脑 (Br) 中的表达差异。【结果】嗅觉电生理研究结果发现, 团头鲂在两种气味刺激后的嗅电反应幅值随刺激浓度增加而增强, 呈明显的剂量-效应关系。行为学实验结果表明, 团头鲂对氯化铵表现为适应, 对血液气味表现为躲避反应。氯化铵和血液刺激诱导 ORs 基因在团头鲂 OE、OB 及 Br 中的表达模式存在显著差异。二者均能诱导 OE 中 *Beta-2*、*Epsilon-10*、*Delta-58* 显著上调; 氯化铵仅上调 OB 中 *Beta-2*, 血液特异性上调 OB 中 *Beta-9*、*Beta-10*、*Epsilon-10*、*Delta-58*; Br 中二者均上调 *Beta-2*、*Beta-11*、*Epsilon-13*, 且氯化铵额外上调 *Beta-9*、*Epsilon-10*。【结论】研究构建了鱼类水下嗅电反应与行为学研究装置, 分别在电生理和行为学水平证实了团头鲂对社会气味和警戒气味的敏感性和差异性行为, 结果为后续深入探究鱼类的嗅觉识别机制奠定了基础。

**关键词:** 团头鲂; 气味刺激; 嗅电反应; 行为学; 嗅觉受体基因

**中图分类号:** S 917.4

**文献标志码:** A

嗅觉在鱼类摄食、发现敌害, 求偶、集群及生殖中都起重要作用<sup>[1-2]</sup>, 鱼类需要敏锐的嗅觉感受系统准确识别环境中复杂的气味信息<sup>[3-4]</sup>。嗅觉受体基因 (ORs) 主要表达于嗅囊 (OE) 的嗅觉感受神经元<sup>[5]</sup>, 嗅觉器官感知外界环境的刺激气味之后, ORs 会与外界气味分子特异结合<sup>[6]</sup>, 化学信号转换为电信号, 经过嗅球 (OB) 传递至中枢神经

系统<sup>[7]</sup>, 最终引发相应的生理和行为反应<sup>[8-10]</sup>。氯化铵作为鱼类排泄物的主要成分, 是重要的环境气味信号; 而同类血液则是典型的警戒气味, 通常预示着捕食风险, 二者均属于鱼类生存过程中需重点识别的负面气味<sup>[11-12]</sup>。选择这两种气味开展研究, 相比食物气味或腐烂气味, 更能反映鱼类对“环境不适”和“生存威胁”的应对机制, 为解

收稿日期: 2025-10-20 修回日期: 2026-01-28

资助项目: 国家自然科学基金 (32341062, 32273109); 中央高校基本科研业务费; 国家大宗淡水鱼类产业技术体系建设专项 (CARS-45-01)

第一作者: 杨惠敏, 从事水生动物遗传育种研究, E-mail: Yhuimin@webmail.hzau.edu.cn

通信作者: 黄欣, 从事水产养殖研究, E-mail: kuale303171@mail.hzau.edu.cn



析鱼类嗅觉识别的生态适应性提供关键模型。Kermen 等<sup>[11]</sup>对斑马鱼 (*Danio rerio*) 的研究中, 已证实, 氯化铵、尿素等社会气味分子可作为鱼类识别同类生理状态的重要化学信号, 而皮肤提取物、血液等警戒气味则能有效触发鱼类的防御行为应答<sup>[13]</sup>。研究表明, 斑马鱼血液与皮肤提取物所激活的 OB 神经区域存在高度重叠特性。鱼类行为学相关研究显示<sup>[14-15]</sup>, 鱼类对警戒气味分子的行为学响应常呈现典型特征, 包括游泳速度先升高后趋于静止, 以及向水体底部定向运动等表现。嗅电实验 (EOG) 技术作为鱼类嗅觉研究中经典且成熟的电生理检测手段, 广泛应用于异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio*)<sup>[9]</sup>、金鱼 (*C. auratus*)<sup>[16]</sup>、银鲑 (*Oncorhynchus kisutch*)<sup>[17]</sup>、金头鲷 (*Sparus aurata*)<sup>[18]</sup> 等多种鱼类的嗅觉功能解析中, 可捕捉气味分子引发的细胞膜电位去极化信号, 精准反映电生理反应的幅值、波形特征及浓度依赖性变化。而 ORs 基因作为鱼类嗅觉识别的分子核心, 根据其结构与功能差异可分为 I 型和 II 型两大类<sup>[19-20]</sup>。其中, 鱼类的 ORs 基因多属于 I 型, 该类型受体的结构特征使其更适配水生环境中的化学信号识别, 主要负责感知并结合水溶性气味分子, 包括 *Beta*、*Delta*、*Epsilon*、*Zeta* 等多个功能亚型<sup>[19-21]</sup>。不同亚型的 ORs 基因在 OE、OB 及脑 (Br) 部的表达模式存在显著性差异<sup>[22]</sup>, 例如 *Beta* 亚型在淡水鱼中存在显著扩张且序列高度保守, *Epsilon* 亚型则与水溶性气味的高特异性识别密切相关<sup>[21]</sup>, 这种表达差异直接决定了鱼类对不同气味分子 (如氯化铵、血液、食物提取物等) 的识别特异性, 是鱼类能够区分“环境不适”和“生存威胁”等不同类型化学信号的关键分子基础<sup>[8,12]</sup>。

团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 隶属鲤形目 (Cypriniformes) 鲤科 (Cyprinidae) 鲃亚科 (Culterinae) 鲂属 (*Megalobrama*), 作为我国重要的淡水经济鱼类, 具有养殖规模大、适应性广等特点, 且已明确其基因组中含 223 个完整 ORs 基因, 其中 *Beta*、*Epsilon* 亚型在淡水鱼中显著扩张且序列高度保守, 与 G 蛋白偶联受体超家族特征一致<sup>[21]</sup>, 为解析淡水鱼水溶性气味识别机制提供了理想的分子基础。本研究通过构建鱼类嗅电反应装置和行为学反应装置, 分别比较 2 种不同气味分子刺激后, 团头鲂的嗅电反应幅值变化及行为学反应差异, 在电生理和行为学水平探究嗅觉与摄食的

关系, 另外, 对不同气味分子刺激后团头鲂 OE、OB、Br 中代表性 ORs 的表达模式进行研究, 为后续深入探究气味分子刺激后团头鲂嗅觉神经元的活化及嗅觉神经编码机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

以华中农业大学水产养殖国家级实验教学示范中心的团头鲂为对象, 每天 11:00 和 18:00 投喂等量饲料, 每 2~3 天更换 1/3 曝气水, 保持适宜的水体环境, 并选择 50 尾生长状态良好的团头鲂幼鱼, [体长 ( $7.41 \pm 0.24$ ) cm, 全长 ( $9.23 \pm 0.30$ ) cm, 体重 ( $6.791 \pm 0.79$ ) g] 开展研究。实验获得了华中农业大学科学伦理委员会批准 (HZA-UFI-2024-0029), 实验过程中操作人员严格遵守华中农业大学实验动物伦理规范, 并按照华中农业大学科学伦理委员会制定的规章制度执行。

### 1.2 气味刺激液的制备

首先用注射器从 4 尾团头鲂背主动脉采集血液, 每尾鱼采集抗凝血 1~2 mL, 所有样本合并为 1 个复合样本, 冰浴保存备用。然后用鱼用生理盐水将血液稀释至不同的倍数  $10^{-8}$ ~ $10^{-4}$  mL/L。氯化铵购自 Sigma-Aldrich 公司 (99%)。将氯化铵制备为  $10^{-1}$  mol/L 的原液, 在实验开始前稀释至  $10^{-7}$ ~ $10^{-3}$  mol/L, 于 4℃ 保存备用。

### 1.3 嗅电反应

参照已有的实验方法<sup>[23]</sup>, 首先将团头鲂置于 45 mg/L 的丁香酚 (Sigma-Aldrich, 99%) 溶液中麻醉 5 min。取出充分麻醉的团头鲂, 随机选择一侧鼻孔, 剪去覆盖在表面的表皮, 充分暴露 OE, 按 0.1 mg/100 g 体重的剂量, 将三碘季铵酚溶液 (1 mg/mL) 通过注射器注入鱼体背肌, 作为神经阻断剂。实验装置: 用纱布将麻醉后的团头鲂包裹并固定于塑料板上, 塑料板放置在装有蒸馏水的水槽中, 保证鱼体浸浴在水中 (图 1)。用乳胶管将含氧 (8.5 mg/L) 的去离子水通入 (43  $\mu$ L/s) 团头鲂的口腔以辅助鱼体的被动呼吸, 在 OE 上方放置一尖端直径约 2 mm 的乳胶细管, 向创面连续注入去离子水, 以形成一层稳定的水膜。使用 232 型甘汞电极对电信号进行记录, 参考电极置于同侧眼眶柔软处, 记录电极轻触 OE 表面, 接地电

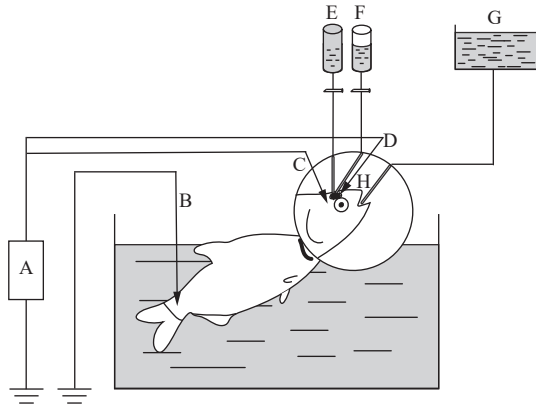


图 1 嗅电反应装置

A. 生物信号采集系统, B. 接地电极, C. 参考电极, D. 记录电极, E. 气味分子刺激液, F. 去离子水 (形成水膜), G. 去离子水 (辅助呼吸), H. 嗅囊。

Fig. 1 Electro-olfactogram device

A. biological signal acquisition system, B. ground electrode, C. reference electrode, D. record electrode, E. odor molecular irritant, F. deionized water (form the water film), G. deionized water (assist breathing), H. olfactory epithelium.

极固定于鱼尾处。打开 BL-420 生物信号采集系统 (成都泰盟软件有限公司), 观测氯化铵溶液和血液刺激后团头鲂的嗅电反应。

单尾实验鱼为一独立测试单元, 接受 5 个浓度梯度的系列刺激并记录为一组实验数据; 每种气味分子设置 5~7 组平行测试。刺激过程按浓度由低到高依次进行, 每间隔 30 秒施加 1 次气味分子刺激, 刺激时长 5~10 s; 单次刺激结束后立即采用去离子水冲洗鱼的 OE, 待 OE 电位幅值恢复至基线水平后, 再进行下一浓度梯度刺激液的施加。实验所得 EOG 幅值均表示为平均值±标准差, 然后通过回归分析和相关性分析量化气味浓度和 EOG 幅值的关系。函数关系用  $E=k \times e^{r \times \log C}$  表示, 其中  $E$  为 EOG 反应振幅;  $C$  为气味分子刺激液浓度;  $r$  为特征常数;  $k$  为标度系数<sup>[24]</sup>。

#### 1.4 行为学反应

随机选取 15 尾健康的团头鲂, 实验前将团头鲂禁食 36 h, 暂养 7 d, 每 2 天更换 1/3 曝气水。实验装置: 蠕动泵的软管一端固定于 50 mL 离心管, 一端用防水胶带固定于水箱 (40 cm × 12 cm × 23 cm) 内, 借助蠕动泵以 43 μL/s 的速度通入气味分子溶液 (图 2)。实验开始前需用黑色幕布遮挡, 防止外界干扰。开启摄像 (SONY, HDR-CX680), 将团头鲂捞入缸中适应 40 min 以确认其是否处于正常状态, 然后向离心管中加入 20 mL 气味分子,

连续刺激 8 min, 继续拍摄 30 min。以单尾实验鱼为独立实验单元, 选取 4~6 尾实验鱼开展独立重复试验。每次实验结束后进行换水清洁, 避免气味分子之间的干扰, 待团头鲂适应 40 min 后进行下一次实验。

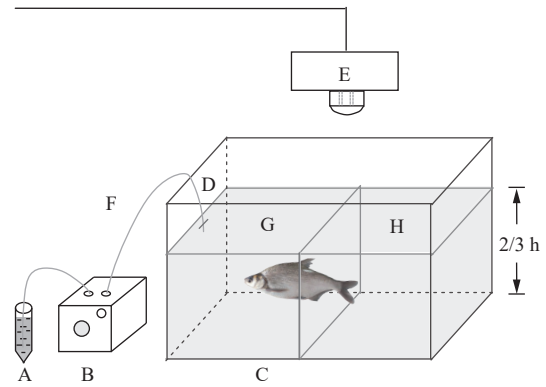


图 2 行为学反应装置

A. 气味分子刺激液, B. 蠕动泵, C. 塑料缸, D. 通入位点, E. 录像机, F. 乳胶管, G. 刺激区, H. 对照区。

Fig. 2 Behavioral response device

A. odor molecular irritant, B. peristaltic pump, C. plastic cylinder, D. pass-in site, E. camera, F. latex tubes, G. stimulation area, H. control area.

行为学拍摄视频平均分为 5 个阶段: 0~2 min (气味分子未加入时期)、2~4 min (气味分子加入初始时期)、4~6 min (气味分子持续加入时期)、6~8 min (气味分子加入末期) 和 8~10 min (气味分子扩散时期)。使用动物行为学分析系统 (Noldus-Etho-Vision 8.0) 进行分析, 设置程序时将行为学装置平均分为 2 个区域 (气味分子区与对照区), 根据以下公式计算出每个时期的偏好指数 (preference index, PI),  $PI=(TA-TC)/(TA+TC)$ 。TA 和 TC 分别表示鱼停留在气味刺激区和对照区的时间段 (min)。

#### 1.5 不同气味刺激后团头鲂代表性 ORs 的组织表达模式

3 尾团头鲂在水箱中适应 40 min 后, 分为 2 组, 分别经氯化铵、血液刺激; 刺激结束后迅速捞出团头鲂并麻醉, 取 OE、OB 和 Br 组织于事先准备好的冻存管, 上述实验设置 3 组生物重复, 即每组刺激均独立使用 3 尾团头鲂完成 1 次实验, 共进行 3 次独立操作。全程冰上操作。保存在 -80℃ 冰箱中用于后续实验。采用 Trizol 试剂盒 (R312-01, 诺唯赞) 提取 RNA, 然后使用反转录试剂盒 (R 411-01, 诺唯赞) 将 RNA 反转录为 cDNA。利

用 Primer 5 软件设计 RT-qPCR 的引物 (表 1)。以  $\beta$ -actin 作为内参基因, 通过 RT-qPCR 检测 OR 在不同组织中的相对表达量。对实验数据进行统计分析, 所有数据结果以平均值 $\pm$ 标准差的形式呈现。使用 SPSS 22 软件对数据进行单因素方差分析。若不同组间的差异显著, 则采用 Tukey 氏多重比较来检验不同处理组间的差异显著性, 当  $P < 0.05$  时, 各数据具有显著差异, 当  $P < 0.01$  时, 各数据具有极显著差异。图像由 GraphPad Prism 8 软件制作。

## 2 结果

### 2.1 两种气味刺激后团头鲂的嗅电反应幅值变化

为明确氯化铵浓度与团头鲂嗅觉电生理响应 (EOG) 的关联规律, 通过检测团头鲂对不同浓度氯化铵溶液的电位响应并进行拟合分析。依次检测了  $10^{-7} \sim 10^{-3}$  mol/L 的氯化铵溶液, 可见随氯化铵浓度升高, 团头鲂嗅觉电位的幅度逐步增强, 平均嗅电反应幅值均已完成定量统计 (表 2)。

低浓度下信号峰平缓且背景噪声占比高, 高浓度时信号峰波动幅度显著增大并可清晰区分于背景。团头鲂对氯化铵的 EOG 反应波形为快速适应的瞬时双相波, 浓度测试中出现多次波形翻转现象 (图 3-a); 以浓度对数为横轴、EOG 响应幅值为纵轴进行拟合发现, 电位响应曲线呈指数上升趋势 (图 3-b); 团头鲂对不同浓度氯化铵的 EOG 响应幅值存在显著性差异 (图 3-c)。

为探究血液浓度与团头鲂嗅觉电生理响应的关联, 通过水下嗅觉电生理技术, 对团头鲂进行嗅觉电位信号检测。结果显示, 随着血液浓度 ( $10^{-7} \sim 10^{-3}$  mL/L) 升高, 嗅电反应幅值呈现明显上升趋势, 其平均嗅电反应幅值已明确 (表 3)。

当用  $10^{-8}$  mL/L 血液刺激时, 团头鲂能产生微弱的嗅电反应, 信号峰相对平缓; 当用  $10^{-7}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-5}$  和  $10^{-4}$  mL/L 的血液刺激时, 团头鲂对血液的 EOG 反应波形既有双向瞬时电位, 也存在单向瞬时电位, 信号波动的幅值随刺激浓度的升高而提升 (图 4-a); 将血液浓度取对数作为横轴、EOG 响应幅值作为纵轴进行拟合后可见, 电位响应呈现出指数上升的变化趋势 (图 4-b); 团头鲂对不同浓度血液的 EOG 响应幅值存在显著差异 (图 4-c)。

### 2.2 两种气味刺激后团头鲂的行为学反应

为探究不同刺激对团头鲂行为偏好的影响,

表 1 RT-qPCR 的 ORs 引物序列

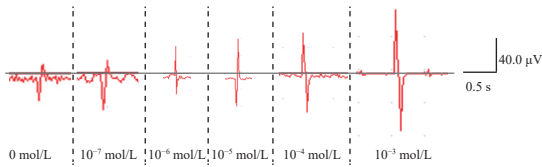
目的基因 target gene	引物序列 primer sequence (5'-3')	产物大小/bp product size
$\beta$ -actin-F	ACCCACACCGTGCCCATCTA	152
$\beta$ -actin-R	CGGACAATTTCTCTTTTCGGCTG	
<i>M. Beta</i> -2-F	TTGTGGATGGCACTGGATCG	204
<i>M. Beta</i> -2-R	TGCCATGTGCTCACAAAAACA	
<i>M. Beta</i> -9-F	GCTTTGTGGATGGCACTGG	287
<i>M. Beta</i> -9-R	AGTCTGCAGTTGGGATCAGA	
<i>M. Beta</i> -10-F	GGCTTAGATCGCTTTGCGG	215
<i>M. Beta</i> -10-R	CACAGGCCAGGCTTACAAGA	
<i>M. Beta</i> -11-F	CCGTAAGTTGCTTTGTGTTGT	246
<i>M. Beta</i> -11-R	GACTCACCAGAAGGAGAGCG	
<i>M. Epsilon</i> -6-F	ACAGAAGAACTGGACGACGA	162
<i>M. Epsilon</i> -6-R	AGGCTCCGTGAAGTGACAAA	
<i>M. Epsilon</i> -7-F	GGGAAACATCAGCTTTGTAAGGG	126
<i>M. Epsilon</i> -7-R	ACAGCATTTCCCACCAGTGT	
<i>M. Epsilon</i> -10-F	TTGGCATGTGCTGCGTTTGG	155
<i>M. Epsilon</i> -10-R	TGCCTTACATCTCCACAAGACA	
<i>M. Epsilon</i> -13-F	GGCAGCAATGACGGAACCTA	148
<i>M. Epsilon</i> -13-R	TCCCAGTAGCAAGAAGAAGGT	
<i>M. Delta</i> -58-F	ACTGAAGACCTGCACACCAC	191
<i>M. Delta</i> -58-R	TCAGAGCCTGAACACTCAGC	
<i>M. Zeta</i> -37-F	ACGCACCAGTGAATTTTGC	172
<i>M. Zeta</i> -37-R	TGGCCACTAACATGAGGTGT	

表 2 团头鲂对不同浓度氯化铵的嗅电反应幅值

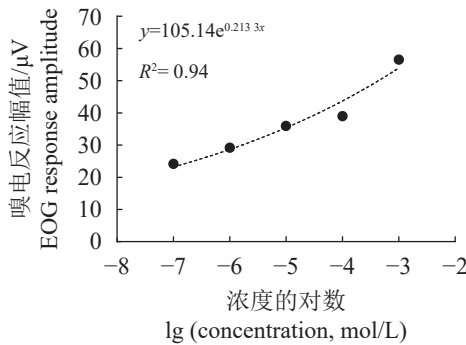
Tab. 2 Amplitude of olfactory response of the *M. amblycephala* to different concentrations of ammonium chloride

气味分子 odor molecule	浓度/(mol/L) concentration	嗅电反应幅值/ $\mu$ V electro olfactogram magnitude
氯化铵 ammonium chloride	$10^{-7}$	$28.03 \pm 0.87$
	$10^{-6}$	$29.17 \pm 1.56$
	$10^{-5}$	$32.64 \pm 9.13$
	$10^{-4}$	$36.79 \pm 1.63$
	$10^{-3}$	$58.73 \pm 15.59$

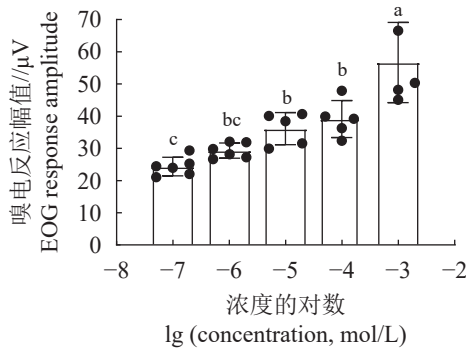
分别设置  $10^{-4}$  mol/L 氯化铵刺激组与  $10^{-5}$  mL/L 血液刺激组, 对行为分析的 5 个阶段进行了偏好指数检测。结果显示, 团头鲂对  $10^{-4}$  mol/L 氯化铵刺激平均偏好指数在 0~2 min ( $0.73 \pm 0.20$ )、2~4 min ( $0.74 \pm 0.10$ ) 阶段处于较高水平, 随后逐步下降  $0.21 \pm 0.05$  (图 5-a)。轨迹图显示, 团头鲂在 5 个阶段的游泳行为未受到明显影响 (图 5-b)。对  $10^{-5}$



氯化铵的浓度  
concentration of ammonium chloride  
(a)



(b)



(c)

图 3 氯化铵组的嗅电反应

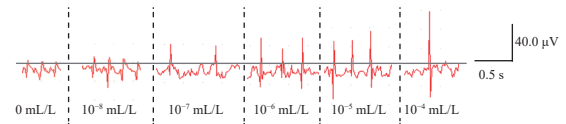
(a) 不同浓度下的嗅电图, (b) 指数方程, (c) 统计分析。不同字母表示有显著性差异 ( $P<0.05$ )。n=5~6。

Fig. 3 EOG response of the ammonium chloride stimulation

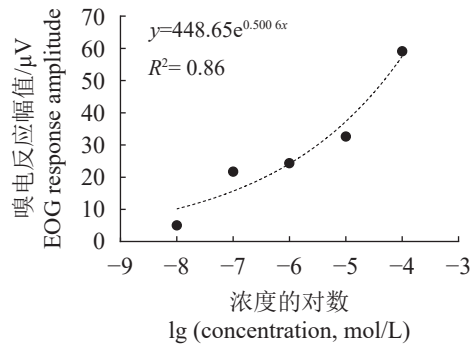
(a) olfactory electrograms at different concentrations, (b) exponential equation, (c) statistical analysis. Different letters indicate significant differences ( $P<0.05$ ). n=5-6.

表 3 团头鲂对不同浓度血液的嗅电反应幅值  
Tab. 3 Amplitude of olfactory response of the *M. amblycephala* to different concentrations of blood

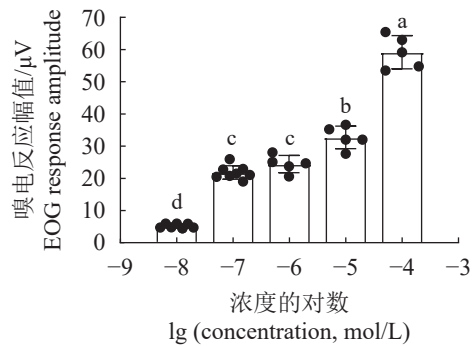
气味分子 odor molecule	浓度/(mL/L) concentration	嗅电反应幅值/μV electro olfactogram magnitude
血液 blood	10 <sup>-8</sup>	4.86 ± 0.88
	10 <sup>-7</sup>	18.69 ± 1.63
	10 <sup>-6</sup>	24.48 ± 0.28
	10 <sup>-5</sup>	31.34 ± 8.78
	10 <sup>-4</sup>	60.32 ± 6.38



血液的浓度  
concentration of blood  
(a)



(b)



(c)

图 4 血液组的嗅电反应

(a) 不同浓度下的嗅电图, (b) 指数方程, (c) 统计分析。不同字母表示有显著性差异 ( $P<0.05$ )。n=5~7。

Fig. 4 EOG response of the blood stimulation group

(a) olfactory electrograms at different concentrations, (b) exponential equation, (c) statistical analysis. Different letters indicate significant differences ( $P<0.05$ ). n=5-7.

mL/L 血液刺激的平均偏好指数在 2~4 min 阶段达到峰值 ( $0.82 \pm 0.24$ ), 之后亦呈递减趋势, 但 8~10 min 阶段 ( $0.21 \pm 0.04$ ) 与氯化铵组的同期水平 ( $0.21 \pm 0.06$ ) 接近 (图 5-c)。在通入血液的前 4 min, 团头鲂的初始游泳模式不变; 从气味分子持续加入时期 (4~6 min) 开始, 团头鲂的游泳区域由气味刺激区向对照区转移 (图 5-d)。

### 2.3 两种气味刺激对团头鲂代表性嗅觉受体基因表达的影响

10<sup>-4</sup> mol/L 氯化铵刺激后, 与对照组相比, 除 Beta-10 外, 其余 9 个基因相对表达量在社会气

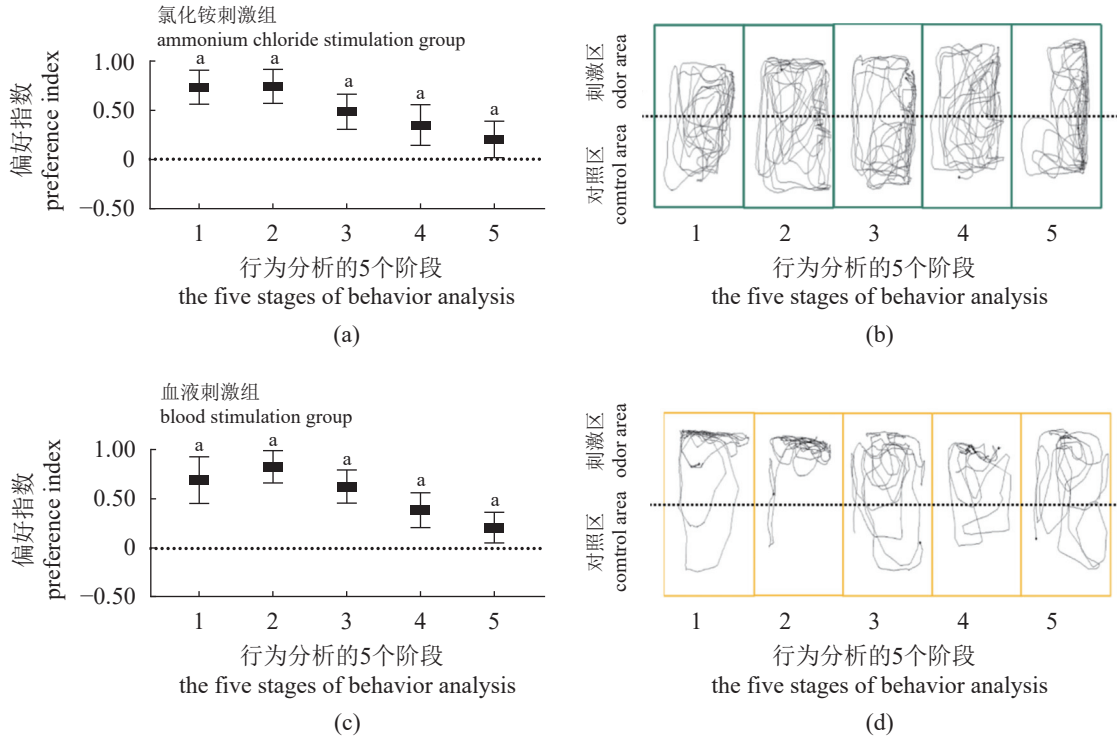


图 5 团头鲂对氯化铵和血液的行为响应

(a) 团头鲂对氯化铵的偏好指数, (b) 氯化铵刺激下团头鲂的行为轨迹, (c) 团头鲂对血液的偏好指数, (d) 血液刺激下团头鲂的行为轨迹。1. 气味分子未加入时期 (0~2 min), 2. 气味分子加入的初始时期 (2~4 min), 3. 气味分子持续加入时期 (4~6 min), 4. 气味分子加入的末期 (6~8 min), 5. 气味分子扩散时期 (8~10 min)。n=4~6。

Fig. 5 Behavioral response of *M. amblycephala* to ammonium chloride stimulation and blood stimulation

(a) preference index analysis of *M. amblycephala* to ammonium chloride, (b) the behavioral trajectory of *M. amblycephala* under ammonium chloride stimulation, (c) preference index analysis of *M. amblycephala* to blood, (d) the behavioral trajectory of *M. amblycephala* under blood stimulation. 1. period without odorant molecules added (0-2 min), 2. initial period of odorant molecule addition (2-4 min), 3. continuous period of odorant molecule addition (4-6 min), 4. final period of odorant molecule addition (6-8 min), 5. period of odorant molecule diffusion (8-10 min). n=4-6.

味组均有显著差异 ( $P < 0.05$ ) (图 6)。Beta-2 在 OE、OB 和 Br 中表达显著上调; Beta-9 在 Br 中表达显著上调; Beta-11 在 OE 和 OB 中表达显著下调, 在 Br 中显著上调; Epsilon-6 在 Br 中表达显著下调; Epsilon-7 在 OE 和 Br 中表达显著下调; Epsilon-10 在 OE 和 Br 中表达上调; Epsilon-13 在 OE 中表达下调, 在 Br 中表达上调; Delta-58 在 OE 中表达显著上调, 在 OB 中表达显著下调; Zeta-37 在 OE 和 OB 中表达下调。

$10^{-5}$  mL/L 团头鲂血液刺激后, 除了 Epsilon-6 外, 其余 9 个基因相对表达量在警戒气味组均有显著差异 ( $P < 0.05$ ) (图 7)。Beta-2 在 OE 和 Br 中表达显著上调; Beta-9 在 OE 中表达显著下调, 在 OB 中表达显著上调; Beta-10 在 OB 中表达显著上调; Beta-11 在 OE 中表达显著下调, 在 Br 中显著上调; Epsilon-7 在 Br 中表达显著下调; Epsilon-10 在 OE 和 OB 中表达显著上调; Epsilon-13

在 OE 中表达显著下调, 在 Br 中表达显著上调; Delta-58 在 OE 和 OB 中表达显著上调, 在 Br 中表达显著下调; Zeta-37 在 OE 中表达显著下调。

### 3 讨论

氯化铵 (社会气味) 和同种血液 (警戒气味) 是存在于鱼类生存环境中的关键化学信号, 对其引发的电生理响应、行为偏好及嗅觉受体基因表达特征的研究, 为解析鱼类嗅觉识别机制与生态适应策略提供了重要视角。本研究中, 随氯化铵和血液浓度的升高, EOG 幅值呈指数上升趋势, 同时  $10^{-3}$  mol/L 氯化铵溶液、 $10^{-4}$  mL/L 团头鲂血液均未达到团头鲂的 EOG 阈值, 表明团头鲂对这两种气味分子具有高嗅觉敏感性。这一剂量-效应关系符合鱼类嗅觉系统的普遍特性, 低浓度气味分子即可触发嗅觉感觉神经元的电生理反应, 且响应强度随气味浓度升高而增强<sup>[25]</sup>。两种气味分子

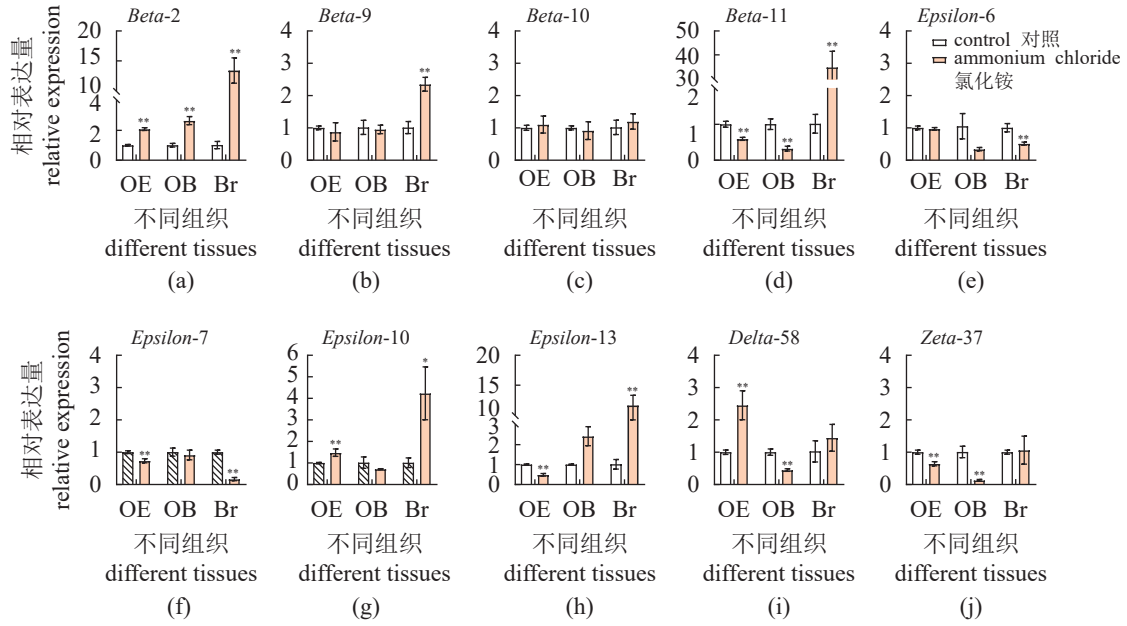


图 6 氯化铵刺激后团头鲂代表性 ORs 基因表达模式

星号表示同一组织两组间有显著性差异, 其中\*表示差异显著 ( $P<0.05$ ), \*\*表示差异极显著 ( $P<0.01$ )。OE. 嗅囊, OB. 嗅球, Br. 脑。下同。

Fig. 6 ORs gene expression in *M. amblycephala* after stimulation by ammonium chloride

The asterisk indicates that there is a significant difference between two groups, in which \* indicates significant difference ( $P<0.05$ ), \*\* indicates extremely significant difference ( $P<0.01$ ). OE. olfactory epithelium, OB. olfactory bulb, Br. brain. The same below.

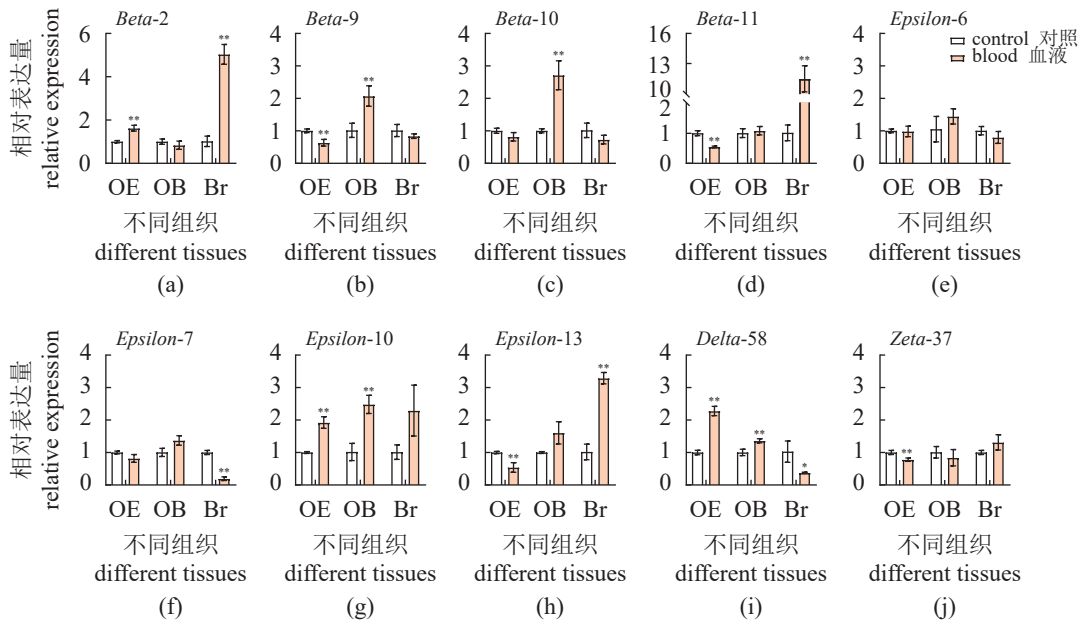


图 7 血液刺激后团头鲂代表性 ORs 基因表达模式

Fig. 7 ORs gene expression in *M. amblycephala* after stimulating by blood

诱导的 EOG 波形存在显著差异: 氯化铵刺激后团头鲂表现为双向瞬时电位, 且随浓度升高出现多次波形翻转; 而血液刺激后既有双向瞬时电位, 也存在单向瞬时电位。嗅电图往往具有十分复杂的图像、呈现出形状各异的波形。大多数鱼类的

电生理研究集中在瞬态响应的峰值振幅上, 结合已有研究可知, 不同鱼类的 EOG 波形存在明显种属差异<sup>[26-27]</sup>: 大西洋鲑 (*Salmo salar*)、褐鳟 (*Salmo trutta*)、红鲑 (*Oncorhynchus nerka*)、海鲇 (*Arius felis*) 等对多种激动剂表现为瞬时单相电位; 异育

银鲫对氨基酸表现为瞬时双相电位<sup>[9]</sup>；中华乌塘鳢 (*Bostrychus sinensis*) 对性外激素的 EOG 为单相负电位<sup>[28]</sup>，与本研究中血液刺激引发的部分单相电位响应相似。

从生理机制来看，EOG 波形差异可能源于嗅觉神经元的激活模式：氯化铵作为水溶性社会气味分子，主要与表达 *Beta*、*Epsilon* 等亚型嗅觉神经元表面的蛋白结合<sup>[29]</sup>，引发嗅觉神经元均匀且持续的去极化-复极化循环，导致双向电位及波形翻转；而血液中含多种警戒信号分子 (如血红蛋白衍生物、免疫因子)，可能同时激活多种嗅觉神经元及非嗅觉化学感受器，部分信号通路引发嗅觉神经元持续去极化 (单向电位)，部分则触发快速极化反转 (双向电位)。这一差异也在其他物种研究中发现：虹鳟 (*O. mykiss*) 对氨基酸的 EOG 表现为快速上升阶段和缓慢下降阶段<sup>[30]</sup>；慈鲷科鱼类 (Cichlidae) 对来自怀卵雌鱼的气味混合物 (含尿液及相关化学分泌物) 存在三阶段电位变化<sup>[31]</sup>。这些研究均证明，EOG 反应对应的空间模式、振荡节律、响应强度及峰值等属性差异，是刺激物种类特异性、鱼类物种差异及神经元响应调控机制差异共同作用的结果<sup>[25]</sup>。行为学分析显示，团头鲂对氯化铵表现为适应性响应，对血液则呈现躲避倾向。鱼类对不同气味分子产生的行为学反应是鱼类在长期演化过程中发展形成的<sup>[32]</sup>，氯化铵作为鱼类尿液中的代谢物，被归类为社会相关气味，本研究结果与斑马鱼的响应模式一致<sup>[11]</sup>，即经氯化铵处理后未引发显著趋避或定向行为。血液是一种强烈的警戒气味，动物对其同类的血液往往具有快速且持续的行为响应<sup>[33]</sup>，实验结果与固有的观念相同：自然界中鱼类会避开由捕食者捕食产生的血液气味。Shabani 等<sup>[12]</sup> 对甲壳类动物加勒比棘龙虾 (*Panulirus argus*) 研究发现，该动物只能依赖嗅觉系统识别同类的血液，对其亲缘关系较近的物种的血液反应偏小，研究证明动物在对警戒气味分子的识别上具有种属特异性；不同种类血液在组成成分、浓度等方面存在差异。该发现提示，未来的研究可进一步探讨团头鲂对不同物种的血液的行为学反应，明确其警戒信号识别的特异性机制。

分子层面研究显示，氯化铵刺激后，*Beta*、*Epsilon*、*Delta* 亚型 ORs 基因在团头鲂 OE、OB、Br 中存在差异性表达。上述基因均属于鱼类水溶性社会信号识别的核心 OR 亚家族。这与草鱼

(*Ctenopharyngodon idella*) 的研究结果相似<sup>[34]</sup>，在食物气味刺激下，ORs 在 OB 和 Br 中高表达。结合团头鲂基因组研究结果<sup>[22]</sup>，*Beta* 与 *Epsilon* 亚家族 OR 基因是其识别水溶性社会信号的关键分子基础。*Beta-2*、*Epsilon-10*、*Delta-58* 在 OE 中显著上调，直接反映嗅觉神经元与氯化铵分子的特异性结合过程，该过程是化学信号向神经信号转化的核心环节<sup>[25]</sup>；*Beta-2* 在 OB 中表达显著上调，对应嗅觉神经元轴突向 OB 特定肾小球的信号传递事件<sup>[35]</sup>；而 *Beta-2*、*Beta-9*、*Beta-11*、*Epsilon-10*、*Epsilon-13* 在 Br 中的表达显著上调，体现了嗅觉信号向端脑、下丘脑等高级神经中枢的进一步传导与整合<sup>[36-37]</sup>，构成鱼类感知社会气味的标准分子通路。值得关注的是，氯化铵刺激未引发团头鲂行为轨迹的显著波动，从神经调控逻辑分析，氯化铵诱导的嗅觉信号经 OR 基因介导的通路传递至脑区后，与中枢神经的环境评估等信号进行整合<sup>[38]</sup>，推测当团头鲂仅感知到氯化铵存在，却未检测到同类聚集或水质恶化等关联线索时，中枢神经系统会判定当前环境无需启动行为调整程序，进而维持行为轨迹的稳定性。这说明“感知”先于“行为”。团头鲂受血液刺激后，*Beta-2*、*Epsilon-10*、*Delta-58* 等 OR 基因在团头鲂 OE、OB 及 Br 的差异化上调，本质是嗅觉系统对警戒信号的特异性识别与分级传递过程。OE 中 *Beta-2*、*Epsilon-10*、*Delta-58* 的显著上调 ( $P < 0.05$ )，对应嗅觉神经元与血液中警戒信号分子 (如血红蛋白衍生物、损伤相关因子) 的特异性结合<sup>[25]</sup>，其表达激活是危险化学信号向神经信号转化的初始步骤；*Beta-9*、*Beta-10*、*Epsilon-10*、*Delta-58* 在 OB 中表达显著上调，反映嗅觉神经元轴突向 OB 特定肾小球的信号传递与汇聚<sup>[18]</sup>；*Beta-2*、*Beta-11*、*Epsilon-13* 在 Br 中表达显著上调，与 Diaz-Verdugo 等<sup>[39]</sup> 在斑马鱼中的研究发现一致 (皮肤提取物刺激可特异性激活端脑背侧区域)，推测对应嗅觉信号向下丘脑等防御相关脑区的传导过程<sup>[40]</sup>，进而触发机体的躲避行为反应。本研究结果与 Kermen 等<sup>[11]</sup> 在斑马鱼中的研究结论相符，即血液气味可特异性激活鱼类的躲避行为。

## 4 结论

本研究通过电生理、行为学与分子生物学多

维度分析, 明确氯化铵 (社会气味) 与同种血液 (警戒气味) 在团头鲂嗅觉识别中的差异化调控, 在电生理水平表现为对氯化铵及团头鲂血液的 EOG 幅值随浓度呈指数增长, 呈剂量-效应关系; 在行为上呈现出适应性维持与主动躲避的差异; 分子层面通过 *OR* 亚家族基因差异化时空表达, 反映了从外周到中枢的嗅觉信号传递过程。这些发现为淡水鱼类嗅觉系统的环境适应机制提供了参考。未来可深入探究 *OR* 基因与气味分子的结合特异性, 以及环境胁迫对该调控网络的影响, 为水产养殖环境优化提供理论支撑。

(作者声明本文无利益冲突)

### 参考文献 (References):

- [ 1 ] Sorensen P W, Fine J M, Dvornikovs V, *et al.* Mixture of new sulfated steroids functions as a migratory pheromone in the sea lamprey[J]. *Nature Chemical Biology*, 2005, 1: 324-328.
- [ 2 ] Barreto R E, Miyai C A, Sanches F H, *et al.* Blood cues induce antipredator behavior in Nile tilapia conspecifics[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e54642.
- [ 3 ] Meredith T L, Kajiura S M. Olfactory morphology and physiology of elasmobranchs[J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2010, 213(20): 3449-3456.
- [ 4 ] Su C Y, Menz K, Carlson J R. Olfactory perception: receptors, cells, and circuits[J]. *Cell*, 2009, 139: 45-59.
- [ 5 ] 朱国利, 唐文乔, 刘东. 鱼类嗅觉受体基因研究进展 [J]. *水产学报*, 2015, 39(6): 916-927.
- Zhu G L, Tang W Q, Liu D. Research progress of olfactory receptor genes in fishes[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(6): 916-927 (in Chinese).
- [ 6 ] Kaupp U B. Olfactory signalling in vertebrates and insects: differences and commonalities[J]. *Nature Reviews Neuroscience*, 2010, 11: 188-200.
- [ 7 ] Santos C R A, Duarte A C, Costa A R, *et al.* The senses of the choroid plexus[J]. *Progress in Neurobiology*, 2019, 182: 101680.
- [ 8 ] Calvo-Ochoa E, Byrd-Jacobs C A. The olfactory system of zebrafish as a model for the study of neurotoxicity and injury: implications for neuroplasticity and disease[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(7): 1639.
- [ 9 ] 赵红月. 异育银鲫摄食物质研究 [D]. 武汉: 中国科学院水生生物研究所, 2007.
- Zhao H Y. Studies on feeding stimulants for gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) [D]. Wuhan: Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, 2007 (in Chinese).
- [10] Franklyn A, Wang Y J, Yu N, *et al.* Transcriptome analysis reveals L-amino acids as olfactory stimulant in the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) [J]. *Journal of Aquaculture Research and Development*, 2017, 8: 1-9.
- [11] Kermen F, Darnet L, Wiest C, *et al.* Stimulus-specific behavioral responses of zebrafish to a large range of odors exhibit individual variability[J]. *BMC Biology*, 2020, 18(1): 66.
- [12] Shabani S, Kamio M, Derby C D. Spiny lobsters detect conspecific blood-borne alarm cues exclusively through olfactory sensilla [J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2008, 211(Pt16): 2600-2608.
- [13] Hussain A, Saraiva L R, Ferrero D M, *et al.* High affinity olfactory receptor for the death-associated odor cadaverine[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110: 19579-19584.
- [14] Ide L M, Urbinati E C, Hoffmann A. The role of olfaction in the behavioural and physiological responses to conspecific skin extract in *Brycon cephalus* [J]. *Journal of Fish Biology*, 2003, 63(2): 332-343.
- [15] Garcia C, Rolán-Alvarez E, Sánchez L. Alarm reaction and alert state in *Gambusia affinis* (Pisces, Poeciliidae) in response to chemical stimuli from injured conspecifics[J]. *Journal of Ethology*, 1992, 10(1): 41-46.
- [16] Sato K, Sorensen P W. The chemical sensitivity and electrical activity of individual olfactory sensory neurons to a range of sex pheromones and food odors in the goldfish[J]. *Chemical Senses*, 2018, 43: 249-260.
- [17] Tierney K B, Taylor A L, Ross P S, *et al.* The alarm reaction of coho salmon parr is impaired by the carbamate fungicide IPBC[J]. *Aquatic Toxicology*, 2006, 79(2): 149-157.
- [18] Velez Z, Costa R A, Wang W, *et al.* Independent effects of seawater pH and high PCO<sub>2</sub> on olfactory sensitivity in fish: possible role of carbonic anhydrase[J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2021, 224(6): jep238485.
- [19] Niimura Y, Nei M. Evolutionary dynamics of olfactory receptor genes in fishes and tetrapods[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(17): 6039-6044.
- [20] Niimura Y. On the origin and evolution of vertebrate olfactory receptor genes: comparative genome analysis among 23 chordate species[J]. *Genome Biology and Evolution*, 2009, 1: 34-44.

- [21] Liu H, Chen C H, Lv M L, *et al.* A chromosome-level assembly of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) reveals an expansion of olfactory receptor genes in freshwater fish[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2021, 38(10): 4238-4251.
- [22] Hu J B, Wang Y J, Le Q J, *et al.* Transcriptome sequencing of olfactory-related genes in olfactory transduction of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) in response to bile salts[J]. *PeerJ*, 2019, 7: e6627.
- [23] Evans J J, Hara T J. The characteristics of the electro-olfactogram (EOG): its loss and recovery following olfactory nerve section in rainbow trout (*Salmo gairdneri*)[J]. *Brain Research*, 1985, 330(1): 65-75.
- [24] Li K, Brant C O, Huertas M, *et al.* Petromyzonin, a hexahydrophenanthrene sulfate isolated from the larval sea lamprey (*Petromyzon marinus* L.)[J]. *Organic Letters*, 2013, 15(23): 5924-5927.
- [25] Laberge F, Hara T J. Neurobiology of fish olfaction: a review[J]. *Brain Research*, 2001, 36(1): 46-59.
- [26] Caprio J. Similarity of olfactory receptor responses (EOG) of freshwater and marine catfish to amino acids[J]. *Canadian Journal of Zoology*, 1980, 58: 1778-1784.
- [27] Hara T J, Kitada Y, Evans R E. Distribution patterns of palatal taste buds and their responses to amino acid in salmonids[J]. *Journal of Fish Biology*, 1994, 45: 453-465.
- [28] 马细兰, 洪万树, 柴敏娟, 等. 中华乌塘鳢对外激素嗅电反应的比较 [J]. 厦门大学学报 (自然科学版), 2003, 42(6): 781-786.
- Ma X L, Hong W S, Chai M J, *et al.* Comparison of electro-olfactogram responses of *Bostrychus sinensis* to sex pheromones[J]. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2003, 42(6): 781-786 (in Chinese).
- [29] Matthews H R, Reisert J. Calcium, the two-faced messenger of olfactory transduction and adaptation[J]. *Current opinion in neurobiology*, 2003, 13: 469-475.
- [30] Hara T J. Effects of pH on the olfactory responses to amino acids in rainbow trout, *Salmo gairdneri*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology. A, Comparative Physiology*, 1976, 54(1): 37-39.
- [31] 赵世亮. 鱼类行为学研究进展 [J]. 畜牧与饲料科学, 2010, 31(9): 102-104.
- Zhao S L. Research progress in fish ethology[J]. *Animal Husbandry and Feed Science*, 2010, 31(9): 102-104 (in Chinese).
- [32] Pereira R T, Leutz J A C M, Valença-Silva G, *et al.* Ventilation responses to predator odors and conspecific chemical alarm cues in the frillfin goby[J]. *Physiology and Behavior*, 2017, 179: 319-323.
- [33] Nikonov A A, Maruska K P. Male dominance status regulates odor-evoked processing in the forebrain of a cichlid fish[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 5083.
- [34] Liu N, Huang X, Zhu D M, *et al.* Food odors alter behavioral responses and olfactory receptors expression in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. *Aquaculture and Fisheries*, 2024, 9(5): 825-832.
- [35] Hansen A, Zielinski B S. Diversity in the olfactory epithelium of bony fishes: development, lamellar arrangement, sensory neuron cell types and transduction components[J]. *Journal of Neurocytology*, 2005, 34: 183-208.
- [36] Miyasaka N, Arganda-Carreras I, Wakisaka N, *et al.* Olfactory projectome in the zebrafish forebrain revealed by genetic single-neuron labelling[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 3639.
- [37] Lal P, Tanabe H, Suster M L, *et al.* Identification of a neuronal population in the telencephalon essential for fear conditioning in zebrafish[J]. *BMC Biology*, 2018, 16: 45.
- [38] Yabuki Y, Koide T, Miyasaka N, *et al.* Olfactory receptor for prostaglandin F<sub>2α</sub> mediates male fish courtship behavior[J]. *Nature Neuroscience*, 2016, 19(7): 897-904.
- [39] Diaz-Verdugo C, Sun G J, Fawcett C H, *et al.* Mating suppresses alarm response in zebrafish[J]. *Current Biology*, 2019, 29(15): 2541-2546.
- [40] Hamdani E H, Døving K B. The functional organization of the fish olfactory system[J]. *Progress in Neurobiology*, 2007, 82: 80-86.

## Two olfactory stimuli on electrophysiological responses, behavioral patterns, and olfactory receptor gene expression in *Megalobrama amblycephala*

YANG Huimin, HUANG Xin\*, XU Shengjie, BI Zhuoling, GAO Zexia, LIU Han  
(Key Laboratory of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** Social odor and alarm odor are key chemical signals for fish to perceive their environment and regulate behavior. The olfactory system underlies the sensitivity and behavioral response differences of fish to different odors, a process that initiates with the specific recognition and signal transduction of olfactory receptors. The molecular and behavioral mechanisms of this process are one of the core contents for analyzing chemical communication in fish. To explore the recognition patterns of the fish olfactory system towards such cues, we assessed the sensitivity and behavioral preference of the *Megalobrama amblycephala* to these odorants using electro-olfactogram recordings and behavioral assays. Furthermore, quantitative real-time PCR (RT-qPCR) was employed to compare the expression levels of 10 representative olfactory receptors (ORs) in the olfactory epithelial, olfactory bulb and brain. EOG results demonstrated that EOG amplitudes increased exponentially in response to both odorants across concentrations, indicating a clear dose-response relationship. Behavioral tests have shown that *M. amblycephala* exhibits adaptive responses to ammonium chloride (without significant attraction or avoidance) and displays avoidance behavior towards conspecific blood. Following ammonium chloride stimulation, the expression levels of *Beta-2*, *Epsilon-10* and *Delta-58* were significantly up-regulated in the olfactory epithelium. *Beta-2* was significantly up-regulated in the olfactory bulb, and *Beta-2*, *Beta-9*, *Beta-11*, *Epsilon-10* and *Epsilon-13* were significantly up-regulated in the brain ( $P < 0.05$ ). Following blood stimulation, the expression of *Beta-2*, *Epsilon-10* and *Delta-58* was significantly up-regulated in the olfactory epithelial, while *Beta-9*, *Beta-10*, *Epsilon-10* and *Delta-58* were significantly up-regulated in the olfactory bulb, and *Beta-2*, *Beta-11* and *Epsilon-13* were significantly up-regulated in the brain ( $P < 0.05$ ). This study developed an integrated underwater system for recording olfactory-electrophysiological responses and behavioral behaviors in fish. At both electrophysiological and behavioral levels, *M. amblycephala* was demonstrated sensitivity to social odorants and alarm stimuli and exhibited significant avoidance responses. These findings provide a foundational basis for further investigation into the mechanisms of olfactory recognition in fish.

**Key words:** *Megalobrama amblycephala*; odor stimulation; electro-olfactogram; behavioral preference; olfactory receptors

**Corresponding author:** HUANG Xin. E-mail: [kuale303171@mail.hzau.edu.cn](mailto:kuale303171@mail.hzau.edu.cn)

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (32341062, 32273109); Fundamental Research Funds for the Central Universities; China Agriculture Research System of MOF and MARA (CARS-45-01)