

环境激素 2,4-二氯苯酚对家蚕生殖发育的影响

袁红霞^{1,4}, 裔洪根², 陈息林³, 徐世清^{1,2}

(1.苏州大学医学部应用生物学系, 江苏 苏州 215123; 2.现代丝绸国家工程实验室, 江苏 苏州 215006; 3.苏州大学分析测试中心, 江苏 苏州 215123; 4.苏州科技学院化学与生物工程学院, 江苏 苏州 215009)

摘要:为了探讨环境激素对鳞翅目昆虫的影响,用添加 2,4-二氯苯酚(2,4-DCP)的人工饲料饲养家蚕,调查 2,4-DCP 对家蚕生殖发育的影响。结果显示,1.60 mmol·kg⁻¹ 以下浓度的 2,4-DCP,对幼虫和蛹的卵巢生长有促进作用 ($P<0.05$);1.60 mmol·kg⁻¹ 的 2,4-DCP 对 5 龄后期快速生长阶段的卵巢表现出抑制作用,但在蛹期卵巢的生长获得补偿。高浓度的 2,4-DCP 对幼虫期、蛹期卵细胞的生长和发育有一定的促进作用($P<0.01$)。2,4-DCP 对家蚕雄性生殖腺的生长、特别是 5 龄后期精巢的快速生长期表现出一定的抑制作用,在蛹期抑制作用表现十分强烈,1.60 mmol·kg⁻¹ 的 2,4-DCP 使雄蛾蚕的精巢几乎完全退化。2,4-DCP 使 5 龄幼虫的精细胞数量微弱减少,至蛹期精细胞和蛾期精子的数量则显著少于对照($P<0.01$)。1.60 mmol·kg⁻¹ 的 2,4-DCP 使雌蛾的产卵数下降到对照的 20%,但造卵数比对照高 1.3 倍,0.80 mmol·kg⁻¹ 以上浓度的 2,4-DCP 使不受精卵率显著增高($P<0.05$)。2,4-DCP 主要通过强烈抑制家蚕雄性生殖腺和生殖细胞的发育以表现出很强的雌激素效应。

关键词:环境激素;2,4-二氯苯酚;鳞翅目昆虫;家蚕;生殖发育

中图分类号:X503.223 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2009)11-2259-05

Effects of 2, 4-Dichlorophenol on the Genital Development of Silkworm(*Bombyx mori*)

YUAN Hong-xia^{1,4}, YI Hong-gen², CHEN Xi-lin³, XU Shi-qing^{1,2}

(1.Department of Applied Biology, Medical College, Soochow University, Suzhou 215123, China; 2.National Engineering Laboratory of Modern Silk, Suzhou 215006, China; 3.Center of Analysis Measurement, Suzhou 215123, China; 4.Chemical and Bioengineering College, Suzhou Science and Technology College, Suzhou 215009, China)

Abstract: The aim of this study was to evaluate the estrogen effects of 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP) on lepidopteron insect. The gonad growth and development of silkworm (*Bombyx mori*) were investigated by feeding with 2,4-DCP-added artificial feedstuffs. Silkworms were placed in culture boxes feeding with 2,4-DCP-added (0.0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 and 3.2 mmol·kg⁻¹) artificial feedstuffs in a culture container kept at constant temperature and humidity in each instar, in which each treatment involved three boxes and each boxes received 50 silkworms. The gonad index, oocyte, spermatid and sperm numbers in fifth instars, pupas and moths were investigated. The egg production, egg deposition numbers and unfertilized egg rates were calculated. The results showed that, with treatment increasing, at 0.2~0.8 mmol·kg⁻¹ 2,4-DCP, the ovary growth and development of fifth instars and pupas were significantly promoted ($P<0.05$), 1.6 mmol·kg⁻¹ 2,4-DCP inhibited the ovary development of fifth instars in 168 h. However, ovary development in pupas were increased obviously. The oocyte development of fifth instars and pupas was elevated at high level. 2,4-DCP decreased the spermary development, especially at late development stages of fifth instars and pupas. The testicles of male moth was retrogressed at 1.6 mmol·kg⁻¹ 2,4-DCP. 2,4-DCP decreased the spermatid numbers of pupas and sperm numbers of moths significantly ($P<0.01$). At 1.6 mmol·kg⁻¹ 2,4-DCP, the egg deposition decreased to 20 percent of control, however the egg production numbers were 1.3 times as much as control. At 0.8 mmol·kg⁻¹ or higher, the unfertilized egg rate increased remarkably ($P<0.05$). The 2,4-DCP functioned as estrogen effects through inhibiting the growth and development of spermary and germ cells.

Keywords: environmental hormone; 2,4-Dichlorophenol (2,4-DCP); lepidopterous insect; *Bombyx mori* L.; genital development

收稿日期: 2009-05-13

基金项目: 国家重点基础研究发展计划“973 项目”(2005CB121005); 苏州大学科研基金(Q3113403, Q3138539)

作者简介: 袁红霞(1971—), 女, 江苏响水人, 在读博士, 主要从事生态毒理学方面的研究。E-mail: yhx99@yeah.net

通讯作者: 徐世清 E-mail: szsqxu@suda.edu.cn

2,4-二氯苯酚(2,4-Dichlorophenol, 2,4-DCP)是重要的化工生产原料,广泛用于生产二氯苯氧酸、酚线磷等农用杀虫剂,除草醚、恶草酮等除草剂,硫双二氯酚等治疗人、畜吸虫病的药物,化妆品、乳剂、树脂、织物及消毒皂的防霉剂 TCS 等,产品涉及人类生产和生活的多个方面。2,4-DCP 在生产过程中“三废”问题,尤其是废气、废渣难以处理。2,4-DCP 进入自然环境的途径多而复杂,在自然水体和空气有一定的浓度积累,目前主要采用竹炭及改性沸石等对 2,4-DCP 进行吸附^[1-2],但无法阻止自然环境中 2,4-DCP 浓度不断增加的趋势。2,4-DCP 是我国经济发达地区饮用水的主要污染物之一,已被列入中国环境优先污染物黑名单的重要污染物^[2]。2005 年,我国 2,4-DCP 的国内产销量高达 1 450 000 t,加强对 2,4-DCP 的致毒机理研究显得尤为重要和迫切。

国内外已有 2,4-DCP 影响水生生态系统藻类、软体动物和鱼类毒性效应的报道^[3-5]。昆虫是地球上种类最多、与自然环境接触密切、对自然环境反应敏感的生物,昆虫对环境适应性的改变,对人类生活和生产有极其重要的影响。农业害虫中有 60%以上的种类是鳞翅目,研究环境激素对鳞翅目昆虫的影响有十分重要的理论和实践意义。目前为止,只有苯酚^[6-8]对鳞翅目昆虫影响的报道,还未见 2,4-DCP 对昆虫影响的报告。我们研究了 2,4-DCP 对家蚕(*Bombyx mori* L.)卵巢细胞(BmN)和苜蓿丫纹夜蛾(*Autographa califobia*)卵巢细胞(sf9)增殖和 DNA 的影响,发现 2,4-DCP 有显著的环境激素活性^[9],表明 2,4-DCP 对鳞翅目昆虫的生殖可能存在影响。本文研究了 2,4-DCP 对鳞翅目模式昆虫——家蚕(*Bombyx mori* L.)生殖发育的影响,为更好地评估 2,4-DCP 对鳞翅目昆虫生理、生态的影响提供基础数据。

1 材料和方法

1.1 材料

家蚕使用人工饲料摄食性很好的皓月品种原种,具有遗传和发育的高度一致性,蚕卵由江苏省蚕种公司提供。2,4-DCP 购自盐城华派化工有限公司,纯度 99.7%,分析纯无水乙醇购自上海生工生物工程有限公司。

1.2 药物添加方法

通过生物实验证实高温消毒不会降低 2,4-DCP 对家蚕的毒性。用少量无水乙醇配制 2,4-DCP 原液,与饲料干粉按梯级混合法混合后,加水充分拌和,装

入保鲜袋,放进饭盒定型,高温消毒(120 ℃, 20 min),低温(5 ℃)保存。根据预备试验结果,实验设 2,4-DCP 浓度 0.00、0.20、0.40、0.80、1.60 和 3.20 mmol·kg⁻¹ 6 区(以饲料重计),各处理均设 3 个重复,每个重复 50 头。

1.3 家蚕饲养

蚕卵用 22~25 ℃, RH 75%~85%, 24 h 光照条件孵化保护(催青)。孵化前 2 d,蚕卵用 1%甲醛和乙醇消毒,干燥后黑暗保护,孵化当日 AM 7:00 人工感光,促使整齐孵化。AM 8:00~9:00 开始给饵,幼虫饲养方法为:1 至 3 龄, 27 ℃、RH 80%~85%; 4 至 5 龄, 25 ℃、RH 75%~80%。1 龄每 3 日给饵 1 次, 2 至 4 龄每 2 日 1 次, 5 龄每日 1 次更换饲料。幼虫开始吐丝时逐条放入纸盒内独立结茧,吐丝结茧环境 25~26 ℃、RH 65%~75%。蚕茧成型后去除纸盒, 25 ℃、RH 75%~80%环境保护至成虫羽化。

1.4 生殖发育调查

5 龄幼虫起蚕给饵前标记雌雄,分别在 5 龄 72、120 和 168 h、蛹期 24 和 168 h、羽化后 24 h 取雌雄各 5 头,调查生殖腺指数作为生殖腺生长指标^[10-11]。生殖腺指数计算公式如下:

$$\text{生殖腺指数}(\%) = (\text{生殖腺湿重}/\text{体重}) \times 100\%$$

然后,在一定量的生理盐水中,用精细手术镊子撕开生殖腺外膜,反复洗涤,血球计数板计数生殖细胞数量,以平均单个性腺的生殖细胞数量作为生殖腺发育指标。在雌蛾产卵结束后立即解剖调查体内残留卵,产卵后第 15 d 调查产卵数和受精卵数,计算造卵数、产卵数和不受精卵率,作为生殖性能的指标。

1.5 数据分析

数据分析采用 SPSS15.0 软件和 Microsoft excel for windows2007。

2 结果与分析

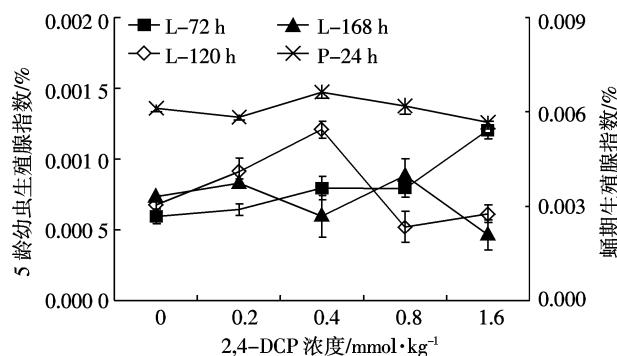
2.1 2,4-DCP 对家蚕雌性生殖腺生长和发育的影响

家蚕的雌性生殖腺从 5 龄开始快速生长和发育,特别是 5 龄第 3 日至化蛹生长发育变化加速,蛹期开始成形卵急速出现,进入另一个生殖发育阶段,一定程度上类似哺乳动物的妊娠期。因此,首先调查了 5 龄幼虫和蛹前期卵巢的重量,计算卵巢重与当时体重的比值,观察 2,4-DCP 对家蚕的雌性生殖腺生长和发育的影响。

图 1 是幼虫 5 龄期和蛹期的调查结果。在 5 龄幼虫期对照蚕的该比值有缓慢增加,基本维持在 6×10^{-4} ~ 7×10^{-4} 之间,表示体重增加和雌性生殖腺增长基

本同步;而 $0.2 \sim 1.6 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ 浓度的 2,4-DCP 添食区,该比值在 5 龄第 3 日全部处理区都高于对照,有明显的浓度效应 ($P < 0.05$), $1.6 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ 浓度区该比值为对照的 202%。由于 5 龄期 2,4-DCP 添食区的雌蚕体重比对照重,上述结果说明,此时绝对重量和相对重量两方面添食区卵巢的生长比对照快。随着体重增加,低浓度区该比值逐渐增大,而高浓度区该比值快速变小,接近吐丝期 $1.6 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ 浓度区则低于对照。说明 2,4-DCP 有促进家蚕幼虫卵巢提前发育或促进卵巢发育的作用,但高浓度在 5 龄后期卵巢快速生长期表现出一定的抑制作用。由于此时的生殖腺很小,与体重的比值也很小,这种影响在蛹期发育过程中有可能获得补偿。 $3.2 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ 浓度的 2,4-DCP 添食区幼虫在 5 龄期全部死亡,已没有生殖发育调查的意义。

调查化蛹后 24 h 雌蛹卵巢的重量,计算生殖腺与体重的比值(图 1),发现在调查浓度范围内该比值虽有微弱变化,但与对照之间没有达到显著差异水平 ($P > 0.05$)。说明家蚕幼虫期连续食下 $1.6 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以下浓度的 2,4-DCP 饲料,对至化蛹为止的卵巢生长和发育没有显著不良影响。



L: 5 龄幼虫期; P: 蛹期; 24, 72, 120, 168 h 表示发育经过时间

图 1 2,4-二氯苯酚对家蚕雌性生殖腺发育的影响

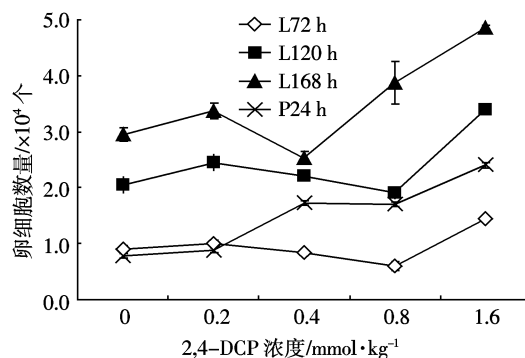
Figure 1 Effect of 2,4-Dichlorophenol on ovary development of female silkworm

2,4-DCP 对生殖腺的重量及其与体重的影响初步说明了其对家蚕具有环境雌激素功能。为了进一步研究 2,4-DCP 作为环境雌激素对家蚕生殖能力的影响,调查了生殖腺中生殖细胞的数量和质量。

家蚕 4 龄以前的雌性幼虫卵巢内只有卵原细胞和初级卵母细胞,从 4 龄开始,卵细胞数量快速增加,5 龄幼虫期和蛹的中前期一直是卵细胞生长的时期;蛹后期开始才进入卵细胞成熟期,有成形卵出现。

孵化后一直用 2,4-DCP 添食,5 龄雌性幼虫卵

巢中卵细胞数量,在 $0.8 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以下浓度区与对照之间有微弱开差,但不显著,并且没有浓度效应 ($P > 0.05$);而 $1.6 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ 浓度区显著高于对照 ($P < 0.01$)(图 2)。说明高浓度的 2,4-DCP 对幼虫期雌性生殖细胞的生长和发育有一定的促进作用。



L: 5 龄幼虫; P: 蛹; 24, 72, 120, 168 h 表示发育经过时间

图 2 2,4-二氯苯酚对家蚕卵细胞数的影响

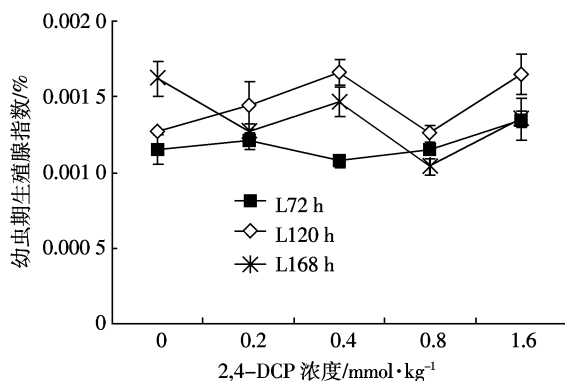
Figure 2 Effect of 2,4-Dichlorophenol on oocyte numbers of silkworm

化蛹后 24 h, $0.4 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以上浓度 2,4-DCP 添食区雌蛹的卵巢中卵细胞数量极显著多于对照 ($P < 0.01$),并且有一定的浓度效应,特别是 $1.6 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ 浓度区,卵细胞数量比对照高 2.33 倍(图 2)。说明 2,4-DCP 对家蚕的卵细胞发育和生长有很强的促进作用。

2.2 2,4-DCP 对家蚕雄性生殖腺生长和发育的影响

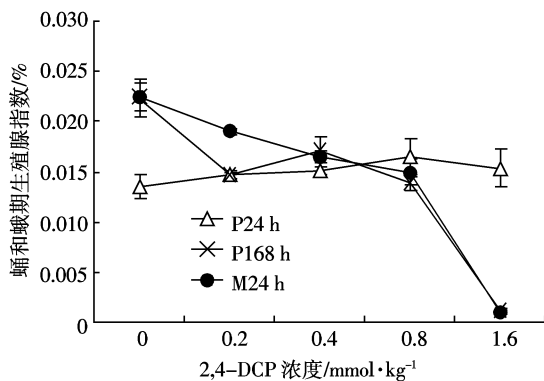
2,4-DCP 对 5 龄幼虫期雄性生殖腺精巢重与体重的比值影响结果如图 3。在 5 龄前期,2,4-DCP 对该比值的影响,0.2 和 $1.6 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ 浓度区该比值略高于对照,而 $0.4 \sim 0.8 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ 浓度区该比值则与对照相近或略低于对照,由于 5 龄期 $1.6 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ 2,4-DCP 添食区的雄蚕体重比对照轻,上述结果不能充分说明此时 2,4-DCP 添食对精巢生长的浓度效应;到 5 龄后期(168 h),所有处理区的该比值都低于对照。说明 2,4-DCP 添食对家蚕雄性生殖腺的生长、特别是 5 龄后期精巢的快速生长期表现出一定的抑制作用,表现出微弱的雌激素效应。

幼虫期一直用 $1.6 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以下浓度的 2,4-DCP 添食,化蛹后 24 h 雄蛹精巢重与体重的比值与对照之间没有显著差异 ($P > 0.05$),但化蛹后 168 h 该比值受到幼虫期添食的强烈抑制;至羽化后 24 h 的雄蛾,该比值受幼虫期 2,4-DCP 添食的影响基本保持这一趋势,而且有明显的浓度效应 ($P < 0.01$)(图 4)。说明 2,4-DCP 的环境雌激素效应在家蚕雄性的生殖



L:5 龄幼虫;24、120、168 h 表示发育经过时间

图 3 2,4-二氯苯酚对家蚕幼虫期雄性生殖腺发育的影响
Figure 3 Effect of 2,4-dichlorophenol on testes development in fifth instars of silkworm



P: 蛹; M: 蛾; 24、168 h 表示发育经过时间

图 4 2,4-二氯苯酚对家蚕蛹和蛾期雄性生殖腺发育的影响
Figure 4 Effect of 2,4-dichlorophenol on testes development in pupas and moths of silkworm

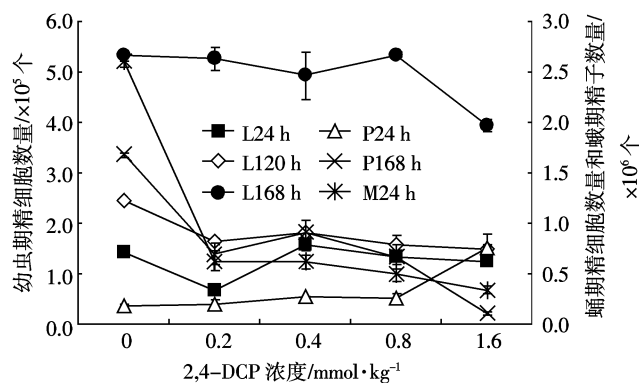
发育后期表现十分明显。

家蚕 4 龄以前的雄性幼虫精巢内只有精原细胞和精母细胞,从 5 龄(或 4 龄末期)开始,精细胞数量快速增加;接近化蛹时,精子开始出现,随后数量快速增加;至羽化时,精巢内基本是精子和少量的精细胞。

孵化后一直用 $1.6 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以下浓度的 2,4-DCP 添食,5 龄期精巢中精细胞的数量比对照未添食蚕有减少的趋势,并且有一定的浓度效应(图 5)。

化蛹后 24 h,2,4-DCP 添食区雄蛹的精巢中精细胞数量与对照没有显著差异($P>0.05$),但从精细胞生成精子的数量少于对照(结果略);化蛹后 168 h,2,4-DCP 添食区的精细胞数量极显著少于对照($P<0.01$), $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ 低浓度区与对照差异也十分显著,浓度效应明显($P<0.01$)(图 5)。说明 2,4-DCP 对家蚕的精细胞发育和生长有很强的抑制作用。

调查羽化 24 h 雄蛾睾丸内的精子数量,结果与蛹中期对精细胞数量的影响相似,2,4-DCP 添食区



L:5 龄幼虫;P:蛹;M:蛾;24、72、120、168 h 表示发育经过时间

图 5 2,4-二氯苯酚对家蚕精细胞和精子数量的影响
Figure 5 Effect of 2,4-dichlorophenol on spermatid and sperm numbers of silkworm

的精子数量极显著少于对照($P<0.01$), $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ 低浓度区与对照差异也十分显著($P<0.01$)(图 5)。说明 2,4-DCP 对家蚕的精子形成有很强的抑制作用。

综合分析以上结果可知,2,4-DCP 对家蚕的精细胞发育和生长及精子形成有很强的抑制作用,即使是本实验中的最低浓度 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$,作用也非常显著,这种影响在蛹的中后期和成虫期表现突出。2,4-DCP 对家蚕雄性生殖细胞的生长和发育有很强的雌激素效应。

2.3 2,4-DCP 对家蚕产卵及受精的影响

用不同浓度的 2,4-DCP 饲料给幼虫添食, $0.2 \sim 0.8 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ 浓度区,雌蛾的造卵数和产出卵数与对照没有出现统计学水平的显著差异($P>0.05$),但 $1.6 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ 浓度区雌蛾的产卵数显著低于对照($P<0.05$),只有对照的 20%,但造卵数比对照高 1.3 倍(图 6,图 7)。从蚕卵的不受精率看, $0.2 \sim 0.4 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ 低浓度区的不受精率与对照无显著差异($P>0.05$),但

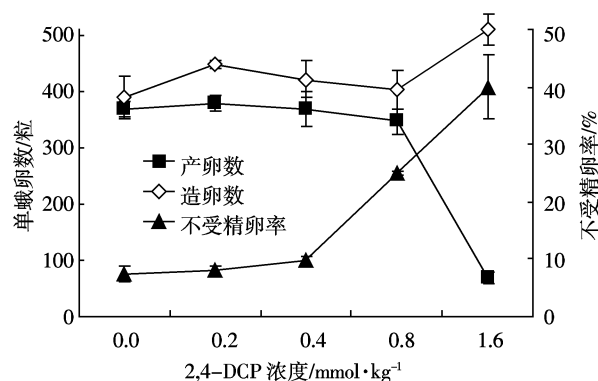


图 6 2,4-二氯苯酚对家蚕造卵、产卵数和不受精卵率的影响
Figure 6 Effect of 2,4-dichlorophenol on egg production, egg deposition numbers and unfertilized egg rate of silkworm

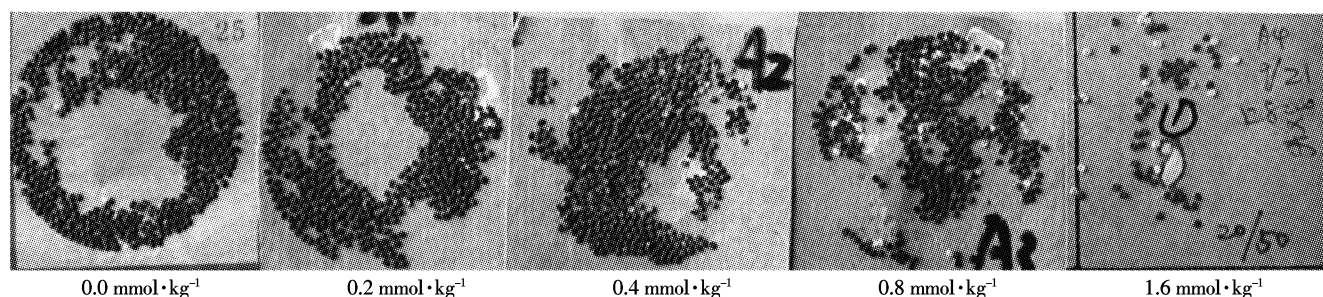


图7 2,4-二氯苯酚对家蚕产出卵的影响

Figure 7 Effect of 2,4-dichlorophenol on laid eggs of silkworm

随着幼虫期饲料中2,4-DCP浓度的增加,不受精卵率越来越高,1.6 mmol·kg⁻¹浓度区达到40%,0.8~1.6 mmol·kg⁻¹浓度组的受精率与对照组差异达到显著水平($P<0.05$)。

3 结论与讨论

2,4-DCP有促进家蚕幼虫卵巢提前发育或促进卵巢发育的作用,1.6 mmol·kg⁻¹以下浓度的2,4-DCP,对幼虫和蛹的卵巢生长有促进作用($P<0.05$);1.6 mmol·kg⁻¹的2,4-DCP对5龄后期快速生长阶段的卵巢表现出抑制作用,但在蛹期卵巢的生长获得补偿。高浓度的2,4-DCP对幼虫期、蛹期卵细胞的生长和发育有一定的促进作用。

2,4-DCP对家蚕雄性生殖腺的生长、特别是5龄后期精巢的快速生长期表现出一定的抑制作用,在蛹期抑制作用表现十分强烈,1.6 mmol·kg⁻¹的2,4-DCP使雄蛾蚕的精巢几乎完全退化。2,4-DCP使5龄幼虫的精细胞数量微弱减少,至蛹期精细胞和蛾期精子的数量则显著少于对照($P<0.01$)。

1.6 mmol·kg⁻¹的2,4-DCP使雌蛾的产卵数下降到对照的20%,但造卵数比对照高1.3倍,0.8 mmol·kg⁻¹以上浓度的2,4-DCP使不受精卵率显著增高($P<0.05$)。

2,4-DCP主要通过强烈抑制家蚕雄性生殖腺和生殖细胞的发育以表现出很强的雌激素效应。

参考文献:

- [1] 奚旦立,孙裕生,刘秀英.环境监测[M].修订版.北京:高等教育出版社,1995:6-7.
XI Dan-li, SUN Yu-sheng, LIU Xiu-ying. Environmental monitoring (revised edition)[M]. Beijing: Higher Education Press, 1995:6-7.
- [2] 金相灿.有机化合物污染化学—有毒有机物污染化学[M].北京:清华大学出版社,1990:10-20,250-265.
JIN Xiang-can. Organic compounds pollution chemistry—toxic organic matters pollution chemistry [M]. Beijing: Tsinghua University Press, 1990:10-20, 250-265.

- [3] Petushok N, Gabryelak T, Palecz D, et al. Comparative study of the xenobiotic metabolizing system in the digestive gland of the bivalve molluscs in different aquatic ecosystems and in aquaria experiments [J]. *Aquat Toxicol*, 2002, 61:65-72.
- [4] Shao Y, Rudolf S S W, Richard Y C K. Biodegradation and enzymatic responses in the marine diatom *Skeletonema costatum* upon exposure to 2,4-dichlorophenol [J]. *Aquat Toxicol*, 2002, 59:191-200.
- [5] 罗义,纪靛靛,苏燕,等.2,4-二氯苯酚诱导鲫鱼活性氧(ROS)的产生及其分子致毒机制[J].环境科学学报,2007,27(1):129-134.
LUO Yi, JI Lian-liang, SU Yan, et al. Reactive oxygen species generation and the molecular toxic mechanism induced by 2,4-dichlorophenol in *Carassius auratus* [J]. *Acta Scientiae Circum Stantiae*, 2007, 27(1):129-134.
- [6] 徐世清,戈志强,郑必平,等.大气苯酚在蓖麻蚕生态系统中的积累和迁移[J].农业环境保护(农业环境科学学报),2000,19(2):72-75.
XU Shi-qing, GE Zhi-qiang, ZHENG Bi-ping, et al. Accumulation and shift of phenols in atmosphere of ecosystem of castor silkworm (*Attacus ricini*) [J]. *Agro-Environment Protection (Journal of Agro-Environment Science)*, 2000, 19(2):72-75.
- [7] 徐世清,司马扬虎,郑必平,等.大气苯酚对蓖麻蚕的影响及其对策[J].中国生态农业学报,2001,9(1):89-91.
XU Shi-qing, SIMA Yang-hu, ZHENG Bi-ping, et al. Effects of air-phenol on the castor silkworm (*Attacus ricini*) and its countermeasures [J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2001, 9(1):89-91.
- [8] 管竞芳,潘如圭,徐凤梅,等.大气苯酚对蚕桑污染毒性[J].农村生态环境,1994,10(2):19-21.
GUAN Jing-fang, PAN Ru-gui, XU Feng-mei, et al. Study on the toxicity of atmospheric phenol polluted mulberry leaf to silkworm *Bombyx mori* [J]. *Rural Eco-Environment*, 1994, 10(2):19-21.
- [9] 裔洪根,徐世清,戴璇颖,等.环境激素2,4-二氯苯酚对鳞翅目昆虫培养细胞的影响[J].安徽农业科学,2007,35(4):992-993.
YI Hong-gen, XU Shi-qing, DAI Xuan-ying, et al. Effect of environment hormone 2,4-dichlorophenol on culture cells of lepidopteran insect [J]. *Journal of Anhui Agri Sci*, 2007, 35(4):992-993.
- [10] Arcand-Hoy L D, Benson W H. Fish reproduction: An ecologically relevant indicator of endocrine disruption [J]. *Environ Toxicol Chem*, 1998, 17(1):49-57.
- [11] 计翔,王培潮,洪卫星.多疣壁虎的繁殖生态研究[J].动物学报,1991,37(2):75-82.
JI Xiang, WANG Pei-chao, HONG Wei-xing. The reproductive ecology of the *Gecko japonicus* [J]. *Acta Zoological Sinica*, 1991, 37(2):75-82.