

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2012.01008

施氏鲟的性腺分化及养殖水温对其性腺分化的影响

张颖¹, 孙慧武², 刘晓勇², 孙大江¹, 曲秋芝¹

1. 中国水产科学研究院 黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070;
2. 中国水产科学研究院, 北京 100141

摘要: 利用组织学方法观察了养殖施氏鲟(*Acipenser schrenckii*)原始生殖细胞(PGCs)的起源、迁移和原始生殖腺的形成及分化。结果表明, 施氏鲟 PGC 最早出现于 1.5 dph (days post-hatching)的仔鱼中肾管(又称吴尔夫氏管)原基一侧的中胚层中。3~7 dph, PGCs 数目增多, 并聚集成细胞索, 17~31 dph, PGCs 沿肠系膜向肾管区下方迁移, 并与生殖嵴细胞一起形成原始性腺; 40~60 dph 时成群的小细胞团由肾区向原始性腺迁移, 原始性腺上皮细胞柱状; 90~120 dph, 原始性腺中出现生殖上皮和性细胞, 脂肪细胞和血管增多。180 dph 以后, 施氏鲟幼鱼性腺在组织学水平上出现光滑型(精巢)和褶皱型(卵巢)2 种性腺组织结构, 标志施氏鲟幼鱼性腺在解剖学水平上已经分化。本实验结果表明, 孵化后 31~180 d 为其性腺分化的关键期。将孵化后 56 d 的仔鱼分别在不同的水温(27℃±0.5℃、24℃±0.5℃、21℃±0.5℃、18℃±0.5℃和 15℃±0.5℃)中培育至 210 d, 组织学观察其性腺的发育和分化, 结果发现, 温度可影响施氏鲟幼鱼性腺分化的时间, 但不影响其性腺分化的方向。高温(24℃和 27℃)可使施氏鲟幼鱼提前性腺分化, 其中 27℃组较对照组(21℃)提前 50 d, 24℃组提前 30 d; 低温(15℃组)则延长幼鱼性腺分化的时间。施氏鲟幼鱼的性别分化不属于温度依赖型。

关键词: 施氏鲟; PGCs; 性腺分化; 温度; 性比

中图分类号: S963

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2012)06-1008-10

施氏鲟(*Acipense schrenckii*)为中国重要的鲟鱼养殖种类之一, 具有生长速度快、抗病力及适应力强、肉质鲜美等优点, 深受养殖户的欢迎^[1-3]。至 2006 年中国已成为世界最大的鲟鱼养殖国, 鲟鱼养殖总量达 21 000 t 左右^[2]。其中, 施氏鲟的养殖量(包括施氏鲟杂交种)占中国鲟鱼养殖总量的 50%以上^[2-3]。目前, 随着野生鲟鱼资源的急剧降低, 国际上对养殖鲟鱼子酱的需求逐年增加。施氏鲟作为中国第一大生产鱼子酱种类, 近 5 年贸易量达 10.12 t, 占总贸易量的 40.85%^[4-5]。因此, 实现鲟鱼的全雌养殖技术, 加快中国鲟类鱼子酱规模化开发, 对于拓展中国鲟鱼养殖产业链、优化产业结构、提高国际市场竞争力、实现

鲟鱼养殖产业的升级具有重要意义^[5]。

鲟鱼的性别鉴别方法作为鲟鱼全雌养殖技术之一, 包括微创法、B 型超声波法、激素测定法和卵黄蛋白原法等, 这些方法在实际生产应用上均具有一定的弊端^[6-7]。而性激素和温度等性别诱导控制技术因其具有操作方便、诱导效果同一等优点, 更易于被水产生产者所接受^[7]。有关温度诱导改变鱼类性别比率的研究报道较多, 如 Devlin 等^[8]的研究表明, 温度变化可影响鱼类的温度性别决定(temperature sex determine, TSD), 即影响鱼类的性腺分化方向。而有关学者^[9-13]对 56 种 TSD 鱼类的研究表明, 温度的高低对 TSD 鱼类的性腺分化方向的影响不同, 多数鱼类为高温导致

收稿日期: 2012-06-19; 修订日期: 2012-08-12.

基金项目: 农业部公益性行业科研专项(201003055); 科技部国家科技支撑计划项目(2012BAD25B10-5); 青年科学基金项目(31201971).

作者简介: 张颖(1977-), 女, 博士, 助理研究员, 从事鱼类繁殖生理学研究. E-mail: juletzhang@hotmail.com

通信作者: 孙慧武, 副研究员. E-mail: sunhw@cafs.ac.cn

雄性比率升高, 而仅有龙溪鳟(*Rivulus marmoratus*)在低温条件下的雄性比率升高。目前, 有关温度对鲟鱼性腺分化的影响研究还尚未见报道。因此, 本实验采用不同养殖温度培育性腺分化敏感期的施氏鲟仔鱼, 观察施氏鲟幼鱼性腺的形成和分化规律, 探讨温度对其性腺分化的影响, 为鱼类的繁殖生理学提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 实验鱼饲养和取样材料

施氏鲟受精卵为 2011 年中国水产科学研究院鲟鱼工程繁育中心全人工繁殖受精卵。孵化车间内常规孵化, 孵化期间水温为 16~17℃, 溶氧>6.0 mg/L。

选取在同一时期出膜的仔鱼用于实验。实验期间仔、幼鱼的养殖条件为: 水温(18±1)℃, 溶解氧>6.0 mg/L, pH 为 7.5±0.1。开口饵料为水蚯蚓, 27 dph(days post-hatching)后投喂配合饲料, 颗粒饲料为中国水产科学研究院黄海水产研究所青岛金海力水产科技有限公司生产的直径 11 mm 鲟鱼配合饲料(粗蛋白质≥40%, 粗脂肪≥16%, 粗纤维≤5%, 粗灰分≤16, 水分≤12%, 赖氨酸≥2.0%)。仔鱼破膜当天为 0 dph, 孵化后分别于 1、3、5、7、10 d 取样 1 次, 此后每 7 d 取样 1 次; 孵化后第 3~7 个月每 15 d 取样 1 次; 每次样本量为 15 尾。

1.2 早期性腺的组织切片制备

取施氏鲟仔、稚、幼鱼样本各 15 尾, 于 Bouin's 液中固定 24 h, 其中全长小于 5 cm 的仔鱼直接固定, 全长 5~10 cm 的稚鱼剪去头尾后固定, 全长大于 10 cm 的幼鱼则采用活体解剖, 取出性腺固定。梯度酒精脱水、二甲苯透明、常规石蜡包埋, 轮式切片机连续切片, 切片厚度 5 μm, H&E 染色, Leica DM4000B 显微镜下观察拍照。全长小于 5 cm 的仔鱼进行全鱼连续切片, 鲟鱼早期性腺分化参照彼尔索夫^[14]的标准。

1.3 温度控制实验

实验采用循环水系统, 水族箱为 95 cm×50 cm×60 cm, 试验鱼为同批鱼卵孵化、驯化至 56 d,

在经充分暴气 3 d 的水中驯养 1 周后, 供试验用。按平均体长、体质量一致的原则, 将实验鱼随机分为 5 个温度处理(15℃, 18℃, 21℃, 24℃和 27℃)组, 温度梯度设置依据施氏鲟幼鱼的最适生长温度(设置养殖低温和养殖高温)。每个温度处理组 3 个重复, 每个重复 30 尾鱼。采用电子温控器控制温度(±0.5℃)。pH 值保持在 7.5 左右, 溶解氧浓度>6.0 mg/L, 光照为自然光源。培育至 210 d 后, 解剖鱼体获取性腺, 于 Bouin's 液中固定 24 h, 其他步骤参见 1.2。显微镜观察性腺的解剖学或细胞学特征, 计算各温度组的雌雄比率。

2 结果与分析

2.1 原始性腺的发生和分化

2.1.1 原始性腺的形成 全鱼连续切片观察发现, 孵化后 1.5 d, 仔鱼全长(7.32±0.16) mm, 原始生殖细胞以单细胞出现在中肾管原基一侧的中胚层, 其体积明显大于周围的体细胞, 呈圆形, 核大, 着色浅, 胞质透明、内有卵黄小块(图版 I-1)。3 dph 仔鱼全长(10.58±0.25) mm, PGCs 以 3 个细胞的形式存在于吴尔夫氏管原基附近(图版 I-2)。5 dph 时多个 PGCs 聚集在肾管和肠管之间(图版 I-3)。7 dph 时形成细胞索(图版 I-4)。

10 dph PGCs 由侧板的中胚层沿肠系膜迁移至肠系膜与肾脏之间(图版 I-5)。孵化后 17 d, 仔鱼全长(20.47±0.47) mm, PGCs 由体细胞包围迁移至中肾管侧腹部(图版 I-6)。孵化后 24 d, 仔鱼全长(24.13±1.04) mm, 腹腔中肾管区下方的腹膜上皮向腹腔内侧突出形成 1 对生殖嵴(genital ridge), PGCs 陆续迁移至生殖嵴, 形成性腺原基雏形(图版 I-7)。

孵化后 31 d, 仔鱼全长(35±2.15) mm, 原始性腺基本形成, 其由扁平的腹膜上皮细胞、生殖腺体细胞和 PGCs 组成(图版 I-8)。40~60 dph, 成群的小细胞团由肾区向原始性腺迁移, 原始性腺上皮细胞柱状(图版 I-9)。

90 dph, 幼鱼体长 103.4~115.8 mm, 原始性腺背面出现 1 层生殖上皮细胞, 腹侧出现脂肪细胞, 靠近柄部出现血管(图版 I-10)。孵化后 120 d,

PGC 增多,核仁染色清晰(图版 I-11)。孵化后 150 d,幼鱼全长 180.4~196.9 mm,原始性腺继续增大,切面呈叶片状(图版 I-12),游离末端脂肪组织变大,血管丰富(图版 I-13)。180 dph,幼鱼体长 238.5~255.9 mm,雌雄幼鱼的性腺在外部形态上不能区分,而在组织学水平上分别出现两种类型性腺,一类为光滑型性腺的精巢(图版 I-15,18)和褶皱型的卵巢 2 种性腺组织结构(图版 I-14,16,17),从解剖学水平标志着卵巢和精巢分化的开始。因此,仔鱼孵化后 24~180 dph,PGC 迁入性腺原基发育为原始性腺为施氏鲟性腺分化的关键期。

2.1.2 卵巢的分化 210 dph 以后,幼鱼体长 308.61~323.9 mm,生殖腺内出现产卵板及第一次成熟分裂的卵母细胞和已经形成的初级卵母细胞(图版 -1, 2),在细胞水平上标志卵巢分化的开始。每个初级卵母细胞由卵泡细胞和颗粒细胞包围(图版 -2),其细胞质均匀、着色浅,细胞核明显,核内富含颗粒,着色较深(图版 -3)。

2.1.3 精巢的分化 与卵巢分化比较,210 dph 以后,幼鱼体长 307.5~325.6 mm,分化精巢内生殖细胞和体细胞数量低(图版 II-4, 图版 -2),其生殖上皮等外部特征与未分化的性腺无明显差异(图版 II-5)。精原细胞呈圆形或椭圆形,细胞质不易着色,核较大,内有一个着色很深的核仁,周围有数个较小的支持细胞包围(图版 II-6)。初级精母细胞聚呈团块状,四周包被间质细胞和髓细胞(图版 II-7)。在细胞水平上,标志精巢分化的开始。

2.2 温度对施氏鲟早期性腺发育和性比的影响

由表 1 和图板 可以看出,温度对施氏鲟的

性别比率无显著性影响。其中,低温抑制施氏鲟性腺的发育,而高温促进了其性腺的发育。与对照组(18℃组)比较,15℃组幼鱼的性腺分化时间推迟,于 210 d 开始性腺分化,雌雄比例为 1:1(图版 -1, 2)。而高温组(24℃和 27℃),施氏鲟幼鱼的性腺分化时间提前,分别于孵化后 130 d 和 150 d 开始性腺分化,雌雄比率为 1:1(图版 -3, 4, 5, 6)。此外,18℃和 21℃组的雌雄比率也均为 1:1(图版 -7,8; 图版 -9,10)。在性腺分化敏感期内,15~27℃的温度范围内,温度不能改变施氏鲟幼鱼的性腺分化方向,但影响其性腺分化时间。

3 讨论

3.1 鲟鱼的性别分化

3.1.1 鲟鱼生殖细胞的基本特征 原始生殖细胞(PGCs)为胚胎发育过程中生殖细胞系的祖细胞,与体细胞系细胞比较,具有显著的组织学特征:1) 细胞体积巨大,尽管不同鱼类 PGCs 直径不同(变化范围为 10~22 μm),但均显著大于周围体细胞,如:约为血细胞的 2.6 倍^[14];2) 核大而圆,直径为 6~10 μm,核质比较高,细胞质较少,着色较淡等^[14-16]。本研究中,施氏鲟的 PGCs 体积明显大于周围的体细胞,呈圆形,核大,着色浅,胞质均质,与小体鲟(*Acipenser ruthenus*)、贝加尔鲟(*A. baerii baicalensis*)、欧洲白鲟(*A. trasmontanus*)以及纳氏鲟(*A. naccarii*)等鲟类的原始性细胞的细胞质特点一致^[14, 17-18]。

鱼类、两栖类和陆栖动物之间的原始性腺细胞(PGCs)数目大致相同,70%脊椎动物的原始性

表 1 培养水温对施氏鲟性腺分化和性别比率的影响

Tab. 1 Effects of temperature on gonadal differentiation and sex ratios of *Amur sturgeon*

n=30

养殖水温/℃ temperature	雌性个体数 numbers of male	雄性个体数 numbers of female	性腺未分化个体数 individual numbers of gonad undifferentiation	雌雄比率 sex ratio (female: male)
15	13	13	4	1 1
18	14	13	3	1 1.07
21	14	15	1	1 0.93
24	14	15	1	1 0.93
27	15	14	1	0.93 1

腺细胞为 20~100 个。其中, 两栖类为 5~23 个, 爬行类 40~50 个, 鸟类为 79~109 个^[14]。由于观察方法和观察时间的不同, 同种或不同种鲟鱼的 PGCs 数目不同, 如小体鲟为 25~74 个, 俄罗斯鲟 (*A. gueldenstaedtii*) 为 32~80 个, 贝加尔湖、鄂毕河和勒那河的西伯利亚鲟分别为 5~50 个、2~24 个和 7~33 个。而闪光鲟 (*A. stellatus* Pallas) 为 23~27 个^[14-15, 19]。本研究中, 施氏鲟幼鱼的 PGCs 为 20~30 个, 与闪光鲟的 PGCs 数目大致相同, 低于其他种类的鲟鱼^[14-19]。

3.1.2 鲟鱼 PGCs 的出现时间、起源和迁移方式

鲟鱼 PGCs 的出现时间不同, 从孵化后几小时到几天不等^[14-19]。本研究中, 施氏鲟仔鱼 PGCs 的出现时间为孵化后 1.5 d, 与小体鲟的孵化后 1 d 基本相同, 晚于鄂毕、勒拿和贝加尔鲟仔鱼的 1~2 h, 早于欧洲白鲟和养殖中华鲟和西伯利亚鲟 (*A. baerii*) 的 3 d。而纳氏鲟的 PGCs 则出现在孵化后 6.5 d^[14-20]。

对多种鱼类的 PGCs 起源和迁移的研究表明, 不同种属鱼类的 PGC 起源和迁移方式不同^[11-18, 21-26]。目前, 多数学者认为鱼类的 PGCs 起源于中胚层或内胚层, 而比尔索夫则认为鱼类的 PGC 最初位于胚外区的后部, 经过不同的方式迁移到生殖嵴^[11-16]。对斑马鱼 (*Brachydanio rerio*) PGC 起源的研究则表明, 斑马鱼的 PGCs 于受精后胚胎发育的 24 h 内出现在胚盘的 4 个不同区域, 然后在原肠期沿背板开始迁移, 于受精后 24 h 迁移到性腺原基^[23-24]。也有研究表明, 鱼类的 PGC 来源于表胚层或中胚层与表胚层之间, 如青鳉 (*Oryzias latipes*) 和大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*)^[27-29]。本研究中, 孵化后 1.5 d 施氏鲟 PGCs 以单个细胞的形式存在于中肾管下消化管上的脏壁中胚层中。

鱼类的 PGCs 迁移方式和途径作为物种特征, 有助于了解鱼类的系统发生关系^[14]。与哺乳动物和鸟类比较, 鱼类的 PGCs 迁移途径主要有: 1) 脏壁中胚层肠系膜迁移到背面的生殖腺原基; 2) 沿体壁中胚层通过体节迁移到生殖腺原基; 3) 经循环系统迁移到生殖腺原基^[15-16, 21, 24]。鲟鱼的 PGCs 沿侧板迁移, 且迁移时间较短^[14]。本研究中, 施

氏鲟 PGCs 沿肾管与肠系膜间的体腔上皮迁移到肾管腹部, 在迁移过程中细胞进行有丝分裂, 属于第一种迁移方式, 本研究结果与纳氏鲟 (*A. naccari*) 等鲟鱼的迁移方式相同^[18]。

3.1.3 鲟鱼性腺分化时间及标志 本研究中, 施氏鲟幼鱼的性腺分化类型与其他种类鲟鱼一样为雌雄异体型, 性腺发育至 180 dph 时, 开始向卵巢或精巢分化^[14, 17-20, 25-26]。此外, 解剖学上不同种类鲟鱼的雌雄分化时间不同, 且差异较大。本研究中, 施氏鲟的性腺分化时间与纳氏鲟和杂交鲟 (*Huso huso* × *A. ruthen*) (6 月龄) 分化时间大致相同, 晚于俄罗斯鲟的 3 月龄, 早于小体鲟 (8 月龄)、短吻鲟 (*A. brevirostrum*) (7 月龄) 和中华鲟 (*A. sinensis*) (9 月龄)^[17-20, 25-26, 30-31]。

鲟科鱼类原始性腺的形态学特征是其性腺性别分化的标志, 存在 2 种不同的外部形态: 1) 性腺生殖上皮呈光滑型, 为雄性性腺; 2) 性腺生殖上皮具有皱褶或生殖上皮沟, 为雌性性腺^[14, 17-20, 25-26]。对中华鲟早期性腺发育的研究表明, 原始性腺切面形态为半圆形的将分化为精巢, 原始性腺具有波浪形皱褶的分化为卵巢^[25]。本研究中, 施氏鲟原始性腺生殖上皮细胞呈柱状, 生殖上皮边缘有明显的凹陷或褶皱的原始性腺发育为卵巢, 而生殖上皮边缘光滑的原始性腺则发育为精巢。

鱼类性腺的外部形态、卵巢腔、精细小管及微血管的位置等作为其性腺分化的标志, 在组织学上也具有一定的指示性, 如有些鱼类的性腺原基的微血管位于性腺中央时, 其具有向卵巢分化的趋势, 而微血管位于背部时, 则向精巢分化^[14-32]。本研究中, 施氏鲟早期性腺发育到一定时期, 性腺内均出现丰富的血管组织, 其中生殖上皮光滑的性腺在脂肪与生殖细胞接触的外部有大血管, 而雌性的性腺的血管多出现在生殖腺的中央部位, 这与刘少军^[16]的报道相同, 对鲟鱼的早期性别判别具有一定意义。

3.2 温度对鲟鱼性分化和性别比率的影响

鱼类的性别决定受遗传、环境或遗传因素和环境因素的共同影响^[33]。其中, 有关环境温度对鱼类性别比率影响的研究较为广泛。目前, 至少

发现有 50 多种温度性别决定(TSD)型海、淡水鱼类的存在^[34]。在鱼类性别分化的敏感期,温度可改变 TSD 鱼类的性别比率,如罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)和欧洲海鲈(*Dicentrarchus labrax* L.)等鱼类的性别比率随着温度的变化而变化^[35-36]。本研究中,施氏鲟的性腺分化不属于温度依赖型,在性腺分化敏感期对仔鱼进行温度处理,其性别比率不受温度的影响。

目前的研究表明,TSD 鱼类的性别分化机制与其未分化性腺的发育修饰有关,既这种修饰过程决定了性别分化相关基因的差异表达,而这种差异表达又受温度的影响^[37]。此外,Navarro-Martín 等^[38]的研究证实了高温促使欧洲海鲈 *cyp19a* 启动子的甲基化修饰水平升高,抑制了 *cyp19a* 的表达,从而抑制了 *SF-1* 和 *Foxl2* 的表达。因此, *cyp19a* 启动子的 DNA 甲基化水平可能是 TSD 脊椎动物性别决定机制的重要组成部分。

参考文献:

- [1] 张颖,孙慧武,徐伟,等. 饲料卵磷脂对施氏鲟血清卵黄蛋白原、卵径及性类固醇激素水平的影响[J]. 中国水产科学, 2010, 17(4): 783-790.
- [2] 孙大江,曲秋芝,张颖,等. 中国的鲟鱼养殖[J]. 水产学杂志, 2011, 24(4): 67-70.
- [3] 曲秋芝,孙大江,王丙乾,等. 施氏鲟卵巢发育的组织学观察[J]. 中国水产科学, 2004, 28(5): 487-492.
- [4] 张颖. 人工养殖施氏鲟性别鉴别及性别控制的比较研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2011.
- [5] 孙大江,马国军,吴文化. 我国鲟鱼籽酱产业现状和发展趋势[J]. 中国水产, 2011(7): 25-21.
- [6] 赵峰,章龙珍,庄平,等. 鲟科鱼类性别鉴别技术的研究进展及其应用[J]. 海洋渔业, 2009, 31(2): 215-220.
- [7] 张颖,孙大江,曲秋芝,等. 不同温度下雌激素对施氏鲟早期性腺发育及血清性激素的影响[J]. 东北农业大学学报, 2011, 42(12): 118-124.
- [8] Guerrero-Estévez S., Moreno-Mendoza N. Sexual determination and differentiation in teleost fish[J]. Rev Fish Biol Fisheries, 2009, DOI 10.1007/s11160-009-9123-4.
- [9] Ospina-Álvarez N, Piferrer F. Temperature-Dependent Sex Determination in Fish Revisited: Prevalence, a Single Sex Ratio Response Pattern, and Possible Effects of Climate Change. PLoS ONE, 2008, 3 (7): e2837 DOI: 10.1371/journal.pone.0002837.
- [10] Wang L H, Tsai CL. Effects of temperature on the deformity and sex differentiation of tilapia, *Oreochromis mossambicus*[J]. J Exp Zool, 2000, 286: 534-537.
- [11] 陈玉红,林丹军,尤永隆. 泥鳅的性腺分化及温度对性腺分化的影响[J]. 中国水产科学, 2007, 14 (1): 74-82.
- [12] Pavlidis M, Koumoundouros G, Steriotti A, et al. Evidence of temperature-dependent sex determination in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) [J]. J Exp Zool, 2000, 287(3): 225-332.
- [13] Harrington RW, Crossman RA. Effects of temperature and sex genotype on meristic counts of the gonochoristic cyprinodontid fish *Rivulus cylindraceus* Poey[J]. Can J Zool, 1976, 54: 245-254.
- [14] 彼尔索夫. 鱼类的性别分化[M]. 北京: 农业出版社, 1981: 14-39.
- [15] 徐红艳,李名友,桂建芳,等. 鱼类生殖细胞[J]. 中国科学: 生命科学, 2010, 40(2): 124-138.
- [16] 刘少军. 革胡子鲶原始生殖细胞的起源、迁移及性腺分化[J]. 水生生物学报, 1991, 15(1): 1-7.
- [17] Akhundov M M, Fedorov K Y. Effect of exogenous estradiol on ovarian development in juvenile sterlet, *Acipenser ruthenus*[J]. J Ichthyol, 1995, 35: 109-120.
- [18] Grandi G, Giovannini S, Chicca M. Gonadogenesis in early developmental stages of *Acipenser naccarii* and influence of estrogen immersion on feminization [J]. Appl Ichthyol, 2007, 23: 3-8.
- [19] Akhundov M M, Fedorov KY. Early gametogenesis and gonadogenesis in sturgeons. On criteria for comparative assessment of juvenile gonadal development in the example of the Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii* [J]. J Ichthyol, 1991, 31: 101-114.
- [20] Grandi G, Chicca M. Histological and ultrastructural investigation of early gonad development and sex differentiation in Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*, Acipenseriformes, Chondrostei) [J]. J Morphol, 2008, 269(10): 1238-1262.
- [21] Saito T, Goto-Kazeto R, Kawakami Y, et al. The mechanism for primordial germ-cell migration is conserved between Japanese eel and zebrafish[J]. PLoS ONE, 2011, 6(9): e24460, DOI: 10.1371/journal.pone.0024460.
- [22] Kurokawa H, Aoki Y, Nakamura S, et al. Time-lapse analysis reveals different modes of primordial germ cell migration in the medaka *Oryzias latipes* [J]. Dev Growth Differ, 2006, 48: 209-221.

- [23] Weidinger G, Wolke U, Köprunner M, et al. Identification of tissues and patterning events required for distinct steps in early migration of zebrafish primordial germ cells[J]. *Development*, 1999, 126: 5295–5307.
- [24] Richardson B E, Lehmann R. Mechanisms guiding primordial germ cell migration: strategies from different organisms[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11: 37–49.
- [25] 陈细华, 危起伟, 杨德国, 等. 养殖中华鲟性腺发生与分化的组织学研究[J]. *水产学报*, 2004, 28(6): 633–639.
- [26] 田美平, 庄平, 张涛, 等. 西伯利亚鲟性腺早期发生、分化、发育的组织学观察[J]. *中国水产科学*, 2010, 17(3): 1496–506.
- [27] Sanchez-Sanchez AV, Camp E, Garcia-Espana A, et al. Medaka oct4 is expressed during early embryo development, and in primordial germ cells and adult gonads[J]. *Dev Dyn*, 2010, 239(2): 672–679.
- [28] Shinomiya A, Tanaka M, Kobayashi T, et al. The vasa-like gene, olvas, identifies the migration path of primordial germ cells during embryonic body formation stage in the medaka, *Oryzias latipes*[J]. *Dev Growth Different*, 2000, 42(4): 317–326.
- [29] Johnston P M. The embryonic history of the germ cells of the largemouth black bass, *Micropterus salmoides salmoides* (Lacépède) [J]. *J Morphol*, 1951, 88(3): 471–542.
- [30] Flynn S R, Benfey T J. Sex differentiation and aspects of gametogenesis in shortnose sturgeon *Acipenser brevirostrum* Lesueur [J]. *J Fish Biol*, 2007, 70: 1027–1044.
- [31] Kijima T, Maruyama T. Histological research for the development of the gonad of hybrid sturgeon, bester (*Acipenser ruthenus* L. male × *Huso huso* L. female) [J]. *Bull Nat Res Ins Aqu*, 1985, 8: 23–29.
- [32] 宋卉, 王树迎. 鱼类原始生殖细胞的研究进展[J]. *吉林畜牧兽医*, 2004(4): 16–18.
- [33] Devlin R H, Nagahama Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences[J]. *Aquaculture*, 2002, 208: 191–364.
- [34] Baroiller J F, D’Cotta H, Saillant E. Environmental effects on fish sex determination and differentiation[J]. *Sex Dev*, 2009, 3(2–3): 118–135.
- [35] Baroiller J F, Nakayama I, Fostier A, et al. Sex determination studies in two species of teleost fish, *Oreochromis niloticus* and *Leporinus elongates*[J]. *Zool Stud*, 1996, 35: 279–285.
- [36] Blazquez M, Zanuy S, Carillo M, et al. Effects of rearing temperature on sex differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) [J]. *J Exp Zool*, 1998, 281: 207–216.
- [37] Spotila R J, Spotila D L, Kaufer F N. Molecular mechanisms of TSD in reptiles: A search for the magic bullet[J]. *J Exp Zool*, 1994, 270(1): 117–127.
- [38] Navarro-Martín L, Viñas J, Ribas L, et al. DNA Methylation of the gonadal Aromatase (cyp19a) promoter is involved in temperature-dependent sex ratio shifts in the European sea bass[J]. *PLoS Genet*, 7(12): 2011, e1002447. DOI:10.1371/journal.pgen.1002447.

Histological observation of gonadal differentiation and effect of rearing temperature on sex differentiation in Amur sturgeon *Acipenser schrenckii*

ZHANG Ying¹, SUN Huiwu², LIU Xiaoyong², QU Qiuzhi¹, SUN Dajiang¹

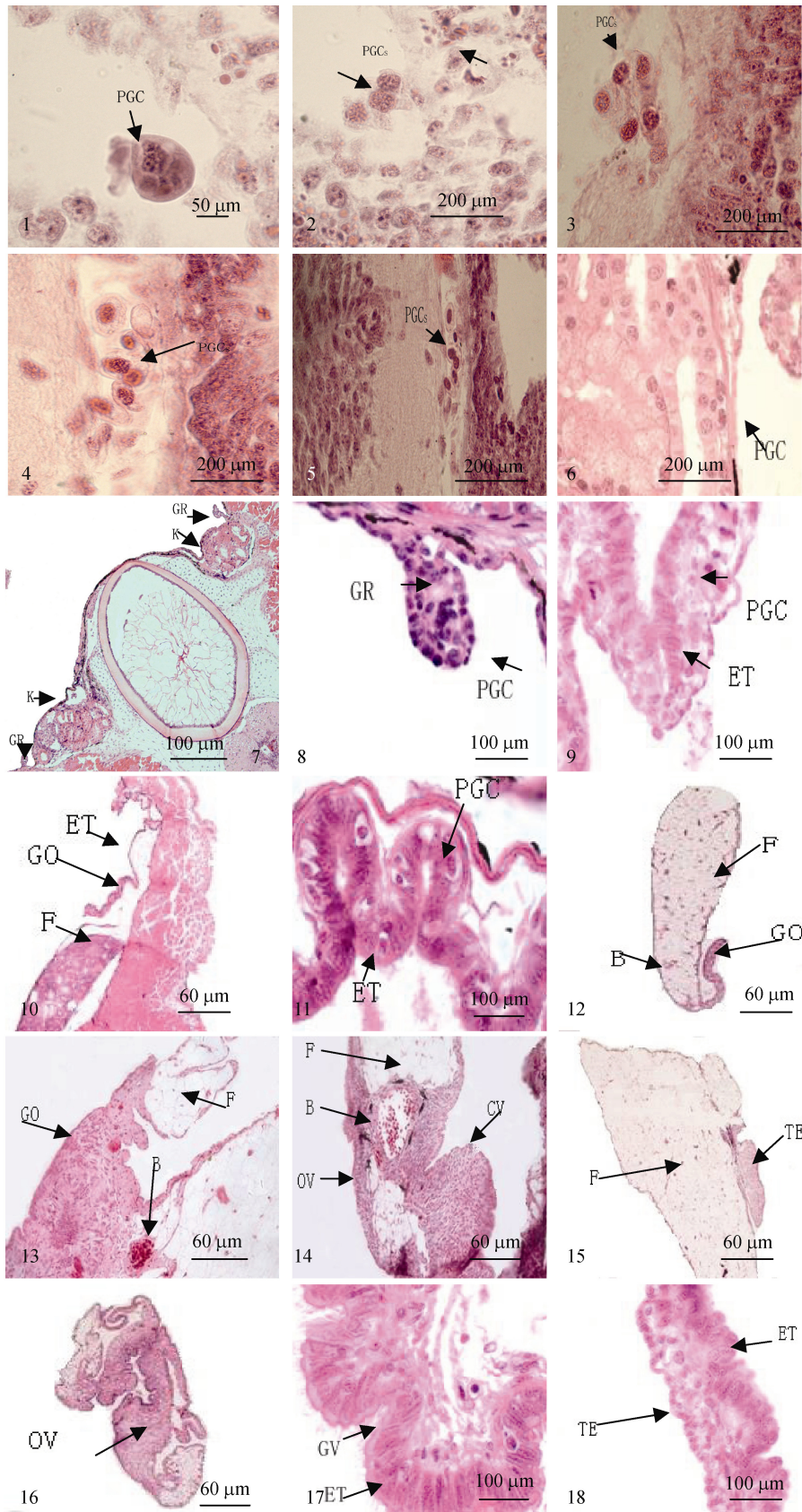
1. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China;

2. Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100141, China

Abstract: Temperature-dependent sex determination has been demonstrated in some species of fish and temperature during the period of sex differentiation typically produces male or female-dominant population. This research investigated the gonadal sex differentiation and effect of rearing temperature on the sex ratio in larval Amur sturgeon *Acipenser schrenckii*. In 1.5 days post-hatch, a PGC is visible along the dorsal epithelium of the body cavity, between the mesentery and the kidney. Later, in 3–7 days post-hatch, the numbers of the primordial germ cells (PGC) increased, and gathered into cell cable. At 17–31 dph, PGCs along the mesenteric migrate to below the kidney area and cells together to form the gonadal ridges. When 40–60 dph, the original gonadal development, groups of small cells from kidney area migrate to original gonad, original gonadal columnar epithelial cells. At 90–120 dph, germinal epithelium and cells appears in the original gonad, fat cells and blood vessels increase. Putative ovaries with notches in the germinal epithelium and presumed testes with smooth germinal epithelium appeared in 180 days post-hatch, signs of juvenile *Acipenser schrenckii* already on the level of differentiation of gonads in anatomy. Ovaries with proliferating oogonia and early meiotic oocytes clusters were observed in 210-day-old juveniles. In a temperature controlled experiment, the proportions of females were 50% at 21°C, 43.3% at 15°C, 43.3% at 18°C, 50% at 24°C, and 46.7% (the same as 1:1 sex ratio) at 27°C. These results suggest that morphological sex differentiation in Amur sturgeon occurs at approximately 180 days after hatch, and though the high temperatures can not change the 1:1 sex ratio in this species, but it can help to promote gonadal development of juvenile Amur sturgeon.

Key words: *Acipenser schrenckii*; PGCs; gonadal differentiation; temperature; sex ratio

Corresponding author: SUN Huiwu. E-mail: sunhw@cafs.ac.cn



图版 I 施氏鲟 PGCs 的出现、迁移及性腺原基的形成

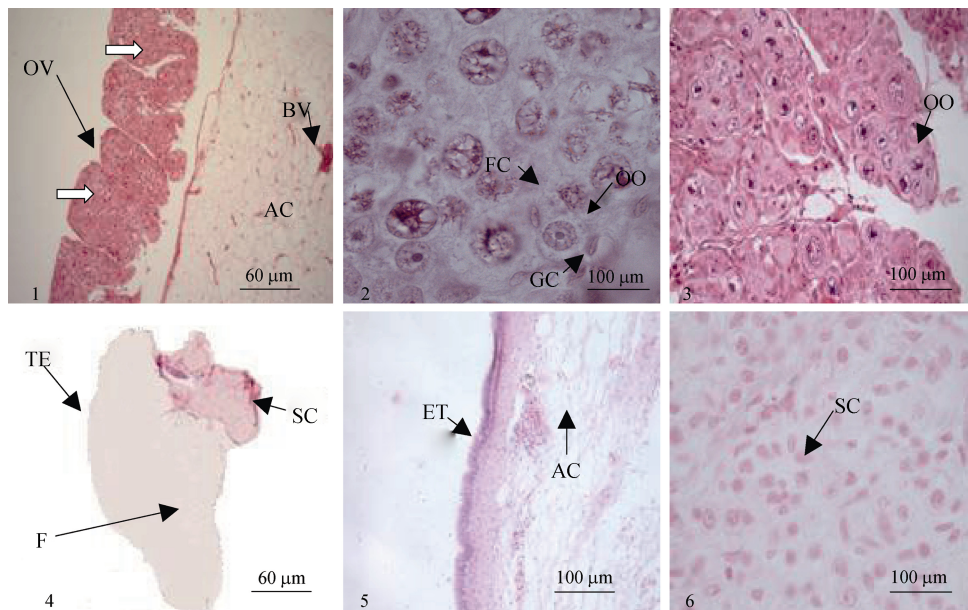
Plate I PGCs arise, migration and gonad primordia formation of Amur sturgeon

图版 I 说明

1. 孵化后 1.5 d 仔鱼的横切, 箭头示单个 PGC 细胞; 2. 孵化后 3 d, 仔鱼的横切, 箭头示 3 个 PGC 细胞; 3. 孵化后 5 d, 示多个 PGCs 在肾管和肠管之间; 4. 孵化后 7 d, PGCs 形成背细胞索; 5. 孵化后 10 d, PGCs 从侧板的中胚层时其沿肠系膜向肾管区迁移; 6. 孵化后 17 d, PGCs 沿腹膜上皮迁移到中肾管下方肠壁上方; 7. 孵化后 24 d, 示 1 对生殖嵴; 8. 孵化后 31 d, 示原始性腺, 箭头示生殖脊和 PGCs; 9. 孵化后 40~60 d, 成群的小细胞团由肾区向原始性腺迁移, 原始性腺上皮细胞柱状; 10. 孵化后 90 d, 原始性腺背面出现生殖上皮细胞, 腹侧出现脂肪细胞, 靠近柄部出现血管; 11. 120 d, PGCs 增多, 核仁染色清晰; 12. 孵化后 150 d, 原始性腺继续增大, 切面呈叶片状; 13. 孵化后 150 d, 游离末端脂肪组织变大, 血管丰富; 14. 孵化后 180 d, 卵巢已经分化; 15. 孵化后 180 d, 精巢已经分化; 16. 孵化后 180 d, 卵巢已经分化; 17. 孵化后 180 d, 分化卵巢的生殖上皮形成皱褶; 18. 孵化后 180 d, 分化精巢的生殖上皮。B: 血管, ET: 生殖上皮, F: 脂肪, GO: 性腺, GR: 生殖脊, GV: 生殖沟, IN: 肠, K: 肾脏, OV: 卵巢, PGC: 原始生殖细胞, TE: 精巢。

Explanation of Plate I

1. 1.5 d after hatching, a PGC appeared in mesoderm, the arrow indicated PGC; 2. 3 d after hatching, three PGCs appeared in Virginia Woolf's tube, the arrow indicated PGCs; 3. 5 d after hatching, multiple PGCs appeared between the renal tube and bowel; 4. 7 d after hatching, PGCs alignment in dorsal side; 5. 10 d after hatching, PGCs migrated from lateral plate mesoderm along the mesenteric and renal districts; 6. 17 d after hatching, PGCs along the peritoneum epithelial migration and the renal tube in the intestinal wall; 7. 24 d after hatching, form a pair of genital Ridge, the arrow indicated the genital Ridge and kidney; 8. 31 d after hatching, PGCs has moved into genital ridge, constitute the original gonad, the arrow indicated PGCs and genital ridge; 9. 40~60 d after hatching, flocks of small cells from kidney area migrated to the original gonad, the original sexual gland epithelial cells cylindrical; 10. 90 d after hatching, epithelial cells of original gonadal occurs on the back, abdominal fat cells appear, blood vessel appears near the shank vascular; 11. 120 d after hatching, PGCs proliferation and nucleolus stain clear; 12. 150 d after hatching, original gonads grow, slices are leaf-shaped; 13. 150 d after hatching, adipose tissue and blood vessel-rich; 14. 180 d after hatching, ovary has differentiated; 15. 180 d after hatching, testis has differentiated; 16. 180 d after hatching, differentiated ovary; 17. 180 d after hatching, germinal epithelium formed folds or groove of the ovary; 18. 180 d after hatching, germinal epithelium of differentiated testis. B: Vascular, ET: Germinal epithelium, F: fat, GO: gonad, GR: gonadal ridge, GV: genital groove, IN: intestinal, K: kidney, OV: ovarian, PGC: primordial germ cells, TE: testes.

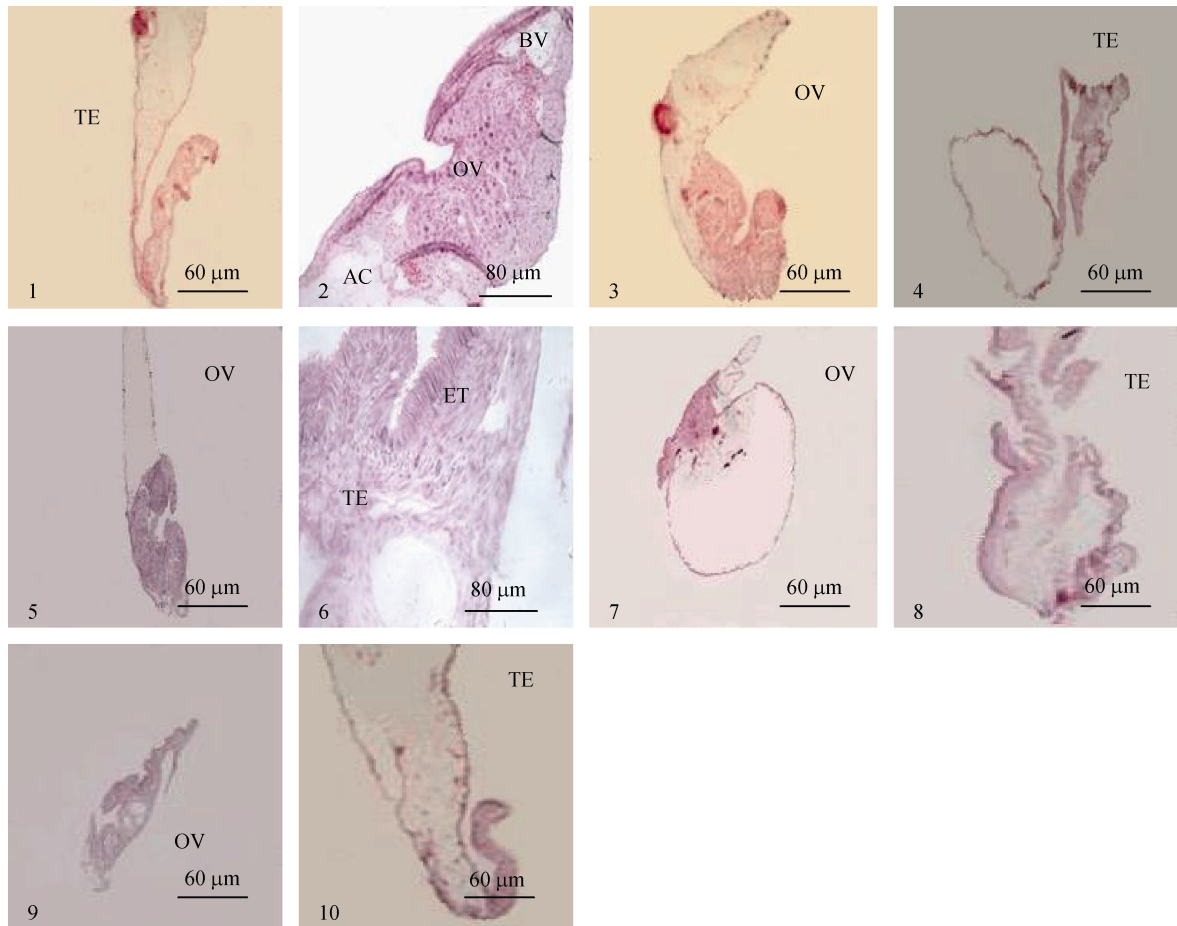


图版 II 施氏鲟卵巢和精巢的分化

1. 孵化后 210 d, 示已分化卵巢, 卵巢内出现产卵板, 箭头示血管; 2. 孵化后 210 d, 示已分化卵巢, 每个初级卵母细胞由卵泡细胞和颗粒细胞包围; 3. 孵化后 210 d, 箭头示正在进行第 1 次成熟分裂的卵母细胞; 4. 孵化后 210 d, 示已分化的精巢, 箭头示脂肪; 5. 孵化后 210 d, 示已分化精巢的生殖上皮; 6. 孵化后 210 d, 箭头示初级精母细胞。AC: 脂肪细胞, BV: 血管, ET: 生殖上皮, F: 脂肪, FC: 卵泡细胞, GC: 颗粒细胞, OO: 卵母细胞, OV: 卵巢, SC: 初级精母细胞, TE: 精巢, \rightleftarrows 示产卵板。

Plate II Ovarian and testicular differentiation of Amur sturgeon

1. 210 d after hatching, showing differentiated ovary, and ovarian board appeared in ovarian, arrow indicating blood vessels; 2. 210 d after hatching, showing the differentiated ovary, and the primary oocyte surrounded by follicular cells and granule cells; 3. primary oocyte, arrow indicating oocyte; 4. 210 d after hatching, showing the differentiated testis, arrow indicating fat; 5. 210 d after hatching, showing germinal epithelium of primary spermatocytes; 6. 210 d after hatching, showing primary spermatocytes. AC: Adipose Cell, BV: Vascular, ET: Germinal epithelium, F: Fat, FC: Follicular cells, GC: Granulosa cells, OO: Oocyte, OV: ovarian, SC: primary spermatocytes, TE: testes, \rightleftarrows eggs plates.



图板 III 温度对施氏鲟性别比率的影响

1. 15°C组精巢; 2. 15°C组卵巢; 3. 27°C组卵巢; 4. 27°C组精巢; 5. 24°C组卵巢; 6. 24°C组精巢; 7. 18°C组卵巢; 8. 18°C组精巢; 9. 15°C组卵巢; 10. 15°C组精巢. AC:脂肪细胞, BV:血管, ET:生殖上皮, OO:卵母细胞, OV:卵巢, TE:精巢.

Plate III Effect of temperature on sex ratio of Amur sturgeon

1. Testis of 15°C group; 2. Ovary of 15°C group; 3. Ovary of 27°C group; 4. Testis of 27°C group; 5. Ovary of 24°C group; 6. Testis of 24°C group; 7. Ovary of 18°C group; 8. Testis of 18°C group; 9. Ovary of 15°C group; 10. Testis of 15°C group. AC: adipose cell, BV: vascular, ET: germinal epithelium, OO: oocyte, OV: ovarian, TE: Testes.