

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2015.14484

不同养殖模式下雌核发育彭泽鲫雌雄鱼性别分化相关基因的表达差异

郑尧¹, 陈家长¹, 郝旭文¹, 王在照²

1. 中国水产科学研究院 淡水渔业研究中心, 农业部长江下游渔业资源环境科学观测实验站, 中国水产科学研究院 内陆渔业生态环境和资源重点开放实验室, 江苏 无锡 214081;
2. 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西 杨凌 712100

摘要: 将同一批经雌核发育产生的 F₁ 彭泽鲫(*Carassius auratus* var. *pengze*) 仔鱼(Pcc)分别置于实验室和池塘进行养殖, 结果发现, 与池塘养殖雄鱼比例极少相比, 实验室养殖中出现了高比例的雄鱼。实验室养殖 PccF₁ 雌雄比例为 (43.6±3.0)%, 而池塘养殖 PccF₁ 雌雄比为 (4.7±1.2)%。本研究比较了不同养殖模式下雌雄鱼性腺分化相关基因的表达, 结果发现除 Pcc-*vasa*、Pcc-*esr1* 和 Pcc-*esr2b* 外, 实验室养殖 PccF₁ 精巢中性腺分化、受体、类固醇合成酶类基因表达极显著 ($P<0.01$) 或显著 ($P<0.05$) 高于卵巢中对应基因的表达量。对于池塘养殖的 PccF₁, 除 Pcc-*amh*、Pcc-*dmrt1b*、Pcc-*dmrt1c*、Pcc-*foxl2*、Pcc-*vasa* 和 Pcc-*esr2b* 外, 精巢中性腺分化和受体基因表达极显著 ($P<0.01$) 或显著 ($P<0.05$) 高于卵巢中对应基因的表达量; 但精巢中绝大部分类固醇合成酶类基因的表达量极显著低于卵巢 ($P<0.01$)。实验室和池塘养殖 PccF₁ 雌雄出现差异表达的基因主要是类固醇合成酶类及调控芳香化酶的转录因子, 这些基因的差异表达可能与雌雄激素的合成或调控相关, 从而导致不同养殖模式出现不同比例的雄鱼。

关键词: 雌核发育; 彭泽鲫; 性腺分化; 受体; 类固醇合成酶类; 基因表达

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2015)05-0986-08

鱼类的性腺分化会受到遗传、基因表达、环境因素、EDCs 处理、种群密度等因素的影响^[1], 性腺分化相关基因参与了鱼类的性别决定过程, 使得鱼类在性腺分化时期就能分化成不同的性别类型。人工雌核发育彭泽鲫(*Carassius auratus* var. *pengze*, Pcc)的后代理论上全部为雌性个体。可以利用雌核发育这一生殖特点, 无需对性别进行区分, 有助于专一地研究性腺发育有关基因在卵巢发育过程中的作用。芳香化酶 CYP19A1A 是雄激素向雌激素转化的关键酶, 诸多的转录因子能够调控芳香化酶的活性, 调节内源雌二醇(17 β -estradiol, E2)的生成, 如参与雄性性别分化的抗缪勒管激

素 AMH, 参与生殖发育调控的孤核受体 DAX1, 类固醇调控因子 1B(NR5A1B), 参与卵巢分化及功能维持的叉头框因子 2(FOXL2), 参与雄性生殖发育及精子维持的 DMRT1^[2-3]。结构高度保守的雌、雄激素受体在性腺发育中也发挥着重要作用^[4], 且外/内源性激素能直接通过胞内的雌、雄激素受体激活基因调控通路。同样, 类固醇合成酶类通路也调控着内源性 E2 的合成并参与性腺发育^[2], 其中的 3 β 羟化类固醇脱氢酶(3 β HSD)负责固醇类激素酮基与羟基之间的转化, 11 β HSD 负责雄激素(11-KT)合成, 胆固醇侧链裂解酶 1(cyp11a1)负责胆固醇侧链羟化, 17 α 羟化酶/17, 20

收稿日期: 2014-11-22; 修订日期: 2015-01-19.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31270547); 国家科技支撑计划项目(2015BAD13B03); 现代农业产业技术体系建设专项资金资助项目(CARS-49).

作者简介: 郑尧(1986-), 男, 助理研究员, 博士, 研究方向为水产品质量安全及分子毒理学. E-mail: zhengy@ffrc.cn

通信作者: 王在照, 教授, 博导, 从事鱼类内分泌干扰物研究. Tel: 029-97082139, E-mail: zzwang@nwsuaf.edu.cn

碳链裂解酶 $\alpha 1$ (*cyp17a1*)负责皮质醇和性激素的生物合成,类固醇急性调节蛋白(*star*)在胆固醇转化为类固醇激素的过程中具有重要作用。

本实验室前期将彭泽鲫 F_1 仔鱼分批在实验室和池塘进行养殖,发现池塘养殖出现极少数雄鱼,经组织学鉴定雄鱼精巢中存在成熟精子和初、次级精母细胞以及空泡状组织,卵巢发育处于 V 期;在实验室条件下获得了较高比例的雄鱼,和雌鱼一样均处于各自发育的 I~II 期。本研究将从实验室和池塘养殖彭泽鲫性腺分化相关基因的表达差异入手,分析造成雄鱼较多的可能原因,为研究雌核发育鱼类的性腺分化机制提供参考依据。目前彭泽鲫 *Pcc-amh*、*Pcc-dax1* 和 *Pcc-cyp19a1a* 基因的全长序列已有报道^[5],作者在前期工作中已获得 3 大类彭泽鲫性腺发育有关基因,这些基因包括:(1)性腺分化相关基因(*Pcc-dmrt1a*、*Pcc-dmrt1b*、*Pcc-dmrt1c*、*Pcc-foxl2*、*Pcc-nr5a1b*、*SRY* 样 HMG 盒结构基因 *9a Pcc-sox9a* 和 DEAD-box RNA 解旋酶 *Pcc-vasa*);(2)雌、雄激素受体基因(雌激素 $\alpha 1$ *Pcc-esr1*、雌激素 $\alpha 2$ *Pcc-er alpha2*、雌激素 $\beta 2$ *Pcc-esr2a*、雌激素 $\beta 1$ *Pcc-esr2b* 和雄激素 *Pcc-ar*);(3)类固醇合成相关基因(*Pcc-3bhsd*、 11β 羟化类固醇脱氢酶 2 *Pcc-11bhsd2*、*Pcc-cyp11a1*、*Pcc-cyp17a1* 和 *Pcc-star*)。本研究将探讨这些差异表达基因在彭泽鲫性腺分化过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人工雌核发育彭泽鲫 F_1 操作在湖北荆州窑湾养殖基地进行(水温 18°C),父本选择基地养殖池中 3~5 龄兴国红鲤(*Cyprinus carpio* var. *singuanensis*),体重(1600 ± 175) g,母本选择 2 龄经雌核发育繁殖的成鱼,体重(450 ± 15) g ($n=300$),分 3 组进行,雌雄鱼采用腹部检查法分辨。人工催产雌鱼采用 HCG [400 IU/kg (体重)]、LRH-A [$6\text{ }\mu\text{g/kg}$ (体重)]和鲤垂体干粉 [1 mg/kg (体重)],用 0.7%NaCl 溶解配合进行,两次注射间隔时间为 6~8 h,雄鱼减半。受精卵转入 20°C 左右的孵化桶

中,子代约 3~4 d 出膜,将半月龄 F_1 鱼苗分别在实验室($120\text{ m}\times 40\text{ m}\times 80\text{ cm}$ 玻璃缸)和水泥池塘中($30\text{ m}\times 12\text{ m}\times 1.5\text{ m}$)进行养殖(各 600 尾)。1 月龄内喂食蛋黄。1~2 月龄按 0.1% (m/m)喂食卤虫(*Artemia naupli*),之后选择商品化的鱼用饲料。卤虫孵化方法:盐度 10~15, pH 为 7.5~8.5,水温控制在 28°C ,充氧培养,第 2 天收卵,喂食之前用清水洗净。彭泽鲫养殖条件为:水温(25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,光周期为 14 h : 10 h (白 : 黑)。

1.2 $PccF_1$ 雌雄鱼比例统计

从荆州窑湾基地彭泽鲫 F_1 中选择 300 尾池塘养殖 2 龄彭泽鲫进行雌雄性别比例的统计,按照传统的腹部检查法(轻压腹部看是否能挤出精液,卵巢腹部柔软)初步将鱼分为两类,并进行性别比例的统计。对实验室养殖的 202 尾 2 龄 $PccF_1$ 进行性别统计,3 个雌雄配合实验中抽样样本量分别为 67 尾、67 尾、68 尾。统计后按 10%比例抽取个体采用组织切片法观察验证。

1.3 $PccF_1$ 雌雄鱼生物学指标测定及总 RNA 的提取、检测与反转录实验

从实验室养殖 F_1 中分别取雌($n=11$)、雄($n=9$)个体,从池塘养殖 F_1 中分别取雌($n=10$)、雄($n=10$)个体,进行生物学指标的测量,性体指数 GSI (gonadosomatic index, %)=性腺重/全重 $\times 100$,肝体指数 HSI (hepatosomatic index, %)=肝胰脏重/全重 $\times 100$,参照文献[6]进行性腺总 RNA 提取、质量检测及反转录操作。

1.4 $PccF_1$ 性腺发育相关基因的表达差异分析

参照文献[6]报道,选取 *Pcc-tubulin* 基因为内参基因,对实验室和池塘养殖的实验鱼进行 3 类相关基因的表达分析,第 1 类是性腺分化相关基因(*Pcc-dmrt1a*、*Pcc-dmrt1b*、*Pcc-dmrt1c*、*Pcc-foxl2*、*Pcc-nr5a1b*、*Pcc-sox9a* 和 *Pcc-vasa*);第 2 类是雌、雄激素受体基因(*Pcc-esr1*、*Pcc-er alpha2*、*Pcc-esr2a*、*Pcc-esr2b* 和 *Pcc-ar*);第 3 类是类固醇合成相关基因(*Pcc-3bhsd*、*Pcc-11bhsd2*、*Pcc-cyp11a1*、*Pcc-cyp17a1* 和 *Pcc-star*)。参照文献[6]进行荧光实时定量 PCR 的操作,引物见表 1。

表 1 本研究中用到的性腺分化相关基因的定量引物
Tab. 1 qRT-PCR primers of sex-differentiation related genes in the present study

定量引物 qRT primer	序列(5'-3') sequence (5'-3')	产物大小/bp product length
Pcc-tubulin-F	CCAGGGCTGTGTTGTAGACC	144
Pcc-tubulin-R	CAATAGTGTAGTGCCACGGGC	
Pcc-dmrt1a-F	GTCGCCTGTCCAGCCATAA	306
Pcc-dmrt1a-R	CGATGGAGTTGATGGAGAAGGT	
Pcc-dmrt1b-F	GGTCGCCATAACGTGTCC	144
Pcc-dmrt1b-R	GATGGAGTCGACAGAGAAGGTT	
Pcc-dmrt1c-F	TATCACCTCAGAACCACCGTC	146
Pcc-dmrt1c-R	TCGGAGAAAACCTGGTATTGC	
Pcc-amh-F	CTCACAGAGTGAGGTGACA	220
Pcc-amh-R	AACAGCAAAACGGATCGGTA	
Pcc-dax1-F	ACTTCGGAGACACAAGAAACCA	232
Pcc-dax1-R	TTCAGGTGTGACAGTGTACCAAGT	
Pcc-foxl2-F	TTTATTTCAGTCAAAAAGTCTCGTC	124
Pcc-foxl2-R	CAAAGCCATTGCGTCATC	
Pcc-nr5a1b-F	GATAAAACCCAGAGGAAACGCT	354
Pcc-nr5a1b-R	GCTGGAAGGATGCGAGGA	
Pcc-sox9a-F	CTGAGGACGGCAGTGAGCA	452
Pcc-sox9a-R	GCTCTTGCTCTCCAGGGCT	
Pcc-vasa-F	TACAGGACCCAAGGTTGTCTATG	234
Pcc-vasa-R	TGTTTCTGGACAGGAGTAGGCT	
Pcc-esr1-F	TACGGCATCAGTAAATCGGGT	111
Pcc-esr1-R	GTGCTCCATTCCTTTGTGCTC	
Pcc-er alpha2-F	TAGGCAGCCCTCGCATCTT	155
Pcc-er alpha2-R	TGCCTGCTGAGAAGATACCACA	
Pcc-esr2a-F	TATCATTATGGTGTGTGGTCGTG	254
Pcc-esr2a-R	ATCCTGCCAGAGAATCGTGTC	
Pcc-esr2b-F	CACACTCTACGCCGTCTCTGC	134
Pcc-esr2b-R	CCCTAACAGCTTTGCATGAGTAA	
Pcc-ar-F	ATGGCAGGTTTGATGGAGGG	125
Pcc-ar-R	TCCACAAGTGAGGGCTCCATA	
Pcc-3bhsd -F	GAGGAATGGAATCCGCAATG	271
Pcc-3bhsd -R	CAGAAGTGAGAAGGGCAGAACG	
Pcc-11bhsd2-F	GTTTGGCATCATAACGGGGC	322
Pcc-11bhsd2-R	TGGGGTTGAGGAGAGAGGAGT	
Pcc-cyp11a1-F	AGGAGCCCCGAAGGAAAC	139
Pcc-cyp11a1-R	ACGACCCATAGCGTACAGACC	
Pcc-cyp17a1-F	GGCTGCAGATATTCCTCAAATAAAG	144
Pcc-cyp17a1-R	TCAGAAGTGCGTCCAAGAGGT	
Pcc-cyp19a1a-F	AGACTGGCCTGGTGGTTGC	174
Pcc-cyp19a1a-R	AGTGCTCAGCTCCCCGTG	
Pcc-star-F	CCACATCCGAAGAAGAAGC	130
Pcc-star-R	CTGGTTACTGAGGATGCTGAT	

1.5 数据分析

应用 SPSS(18.0 版本)统计学分析软件对实验数据进行整理分析。实验数据采用相对表达量的计算方法,即相对表达量=2^{-ΔΔC_t} [7], 数据结果均用平均值±标准差($\bar{x} \pm SD$)表示。基因表达和激素含量测定使用 t 检验, $P < 0.05$ 认为差异显著, $P < 0.01$ 认为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 PccF₁ 雌雄鱼生物学指标及性别比例

实验室养殖 PccF₁ 雌雄鱼在体长体重指标上有极显著的差异($P < 0.01$, 表 2), 但雄鱼 GSI 极显著低于雌鱼($P < 0.01$), HSI 显著高于雌鱼($P < 0.05$)。池塘养殖 PccF₁ 雌鱼体长体重极显著高于雄鱼

($P < 0.01$, 表 2), 雄鱼 GSI 极显著低于雌鱼($P < 0.01$), 但 HSI 雌雄鱼没有显著性的变化($P > 0.05$)。

从实验室采集的样本数据($n=202$)看, 在 3 种不同的雌雄配对组合($n=67, 67, 68$)中分别获得了 27 尾、31 尾、30 尾总共 88 尾雄鱼, 雌鱼共 114 尾; 而池塘养殖群体中在 3 种不同的雌雄配对组合($n=100$ 尾/缸)中分别获得了 4、4、6 尾总共 14 尾雄鱼, 雌鱼共 286 尾; 雄雌比例实验室养殖 PccF₁ 为 (43.6±3.0)%, 而池塘养殖 PccF₁ 为 (4.7±1.2)%。组织学研究结果表明, 池塘养殖组中的雄鱼精巢中存在成熟精子和初、次级精母细胞以及空泡状组织, 卵巢发育处于 V 期; 实验室条件下获得了较高比例的雄鱼, 均处于各自发育的 I~II 期。

表 2 实验室和池塘养殖彭泽鲫 F₁ 生物学指标
Tab. 2 The bioindicator for F₁ offspring of *Carassius auratus* var. *pengze* cultured in laboratory and pond conditions

养殖环境 culture environment	性别 sex	体重/g body weight	全长/cm total length	性体指标/% GSI	肝体指标/% HSI
实验室 laboratory	雄 male	7.755±1.470	7.032±1.323	0.679±0.236	6.492±1.068
	雌 female	7.978±1.124**	7.392±1.406**	2.167±1.195**	4.565±2.549*
池塘 pond	雄 male	379.165±11.627	32.01±2.10	1.421±0.364	6.790±0.684
	雌 female	450.259±15.256**	38.45±4.05**	2.087±0.591**	6.556±0.951

注: **表示同一养殖环境下雌雄间差异极显著($P < 0.01$), *表示差异显著($P < 0.05$).
Note: ** stands for highly significant difference between the males and the females under identical culture environment ($P < 0.01$), while * stands for significant difference ($P < 0.05$).

2.2 实验室养殖 PccF₁ 性腺中性腺分化相关基因表达差异

实验室养殖 PccF₁ 雌雄鱼性腺中性腺分化相关基因表达差异见图 1。结果表明, 雄鱼 *Pcc-dax1*、*Pcc-dmrt1a*、*Pcc-nr5a1b*、*Pcc-sox9a* 表达极显著高于雌鱼($P < 0.01$), 雄鱼 *Pcc-dmrt1b* 和 *Pcc-dmrt1c* 表达显著高于雌鱼($P < 0.05$), 但雄鱼 *Pcc-vasa* 表达极显著低于雌鱼($P < 0.01$)。雄鱼 *Pcc-er alpha2*、*Pcc-esr2a* 表达极显著高于雌鱼($P < 0.01$), 雄鱼 *Pcc-ar* 表达显著高于雌鱼($P < 0.05$), 但是雄鱼 *Pcc-esr1* 和 *Pcc-esr2b* 表达分别极显著($P < 0.01$)和显著($P < 0.05$)低于雌鱼。雄鱼 *Pcc-3bhsd*、*Pcc-11bhsd2*、*Pcc-cyp11a1*、*Pcc-cyp17a1* 和 *Pcc-star* 表达极显著高于雌鱼($P < 0.01$), 但是雌雄 *Pcc-cyp19a1a* 表达却没有显著性的变化($P > 0.05$)。

2.3 池塘养殖 PccF₁ 性腺中性腺分化相关基因表达差异

池塘养殖 PccF₁ 雌雄鱼性腺中性腺分化相关基因表达差异如图 2 所示, 结果表明, 雄鱼 *Pcc-dax1*、*Pcc-nr5a1b*、*Pcc-sox9a* 表达显著高于雌鱼($P < 0.05$), 雄鱼 *Pcc-amh* 表达极显著低于雌鱼($P < 0.05$), *Pcc-dmrt1b*、*Pcc-dmrt1c* 和 *Pcc-vasa* 表达显著低于雌鱼($P < 0.05$), 但是 *Pcc-dmrt1a* 表达雌雄无差异($P > 0.05$)。雄鱼 *Pcc-esr1*、*Pcc-er alpha2*、*Pcc-ar* 表达极显著高于雌鱼($P < 0.01$), 但是雄鱼 *Pcc-esr2b* 表达显著低于雌鱼($P < 0.05$), 而 *Pcc-esr2a* 表达雌雄鱼没有显著性差别($P > 0.05$)。雄鱼 *Pcc-cyp11a1* 表达极显著高于雌鱼($P < 0.01$), 雄鱼 *Pcc-11bhsd2*、*Pcc-cyp17a1*、*Pcc-cyp19a1a* 和 *Pcc-star* 表达极显著低于雌鱼($P < 0.01$), 而 *Pcc-3bhsd* 表达雌雄间只有显著差别($P < 0.05$)。

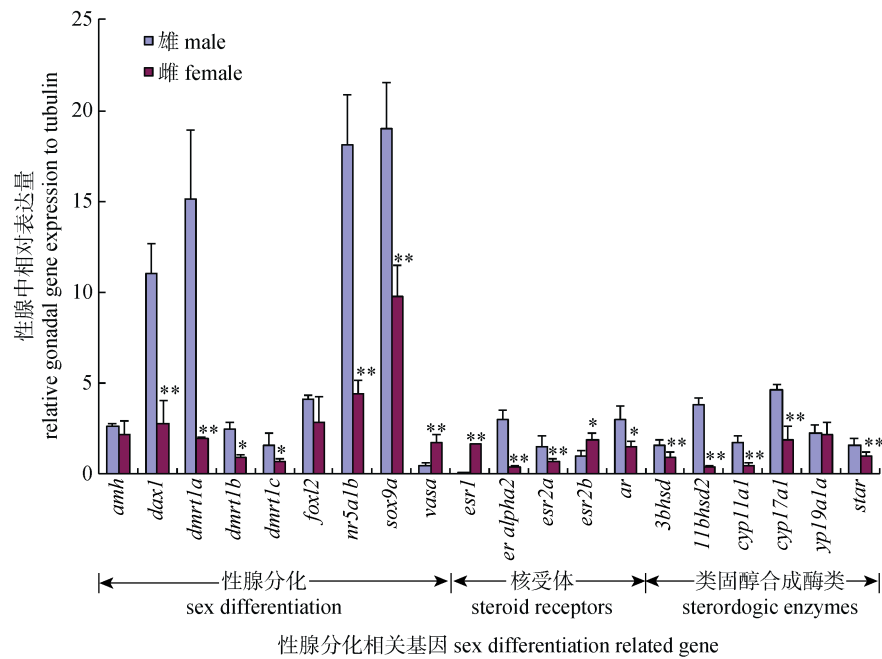


图 1 实验室养殖 PccF₁ 雌雄鱼性腺中性腺分化相关基因表达差异比较
*表示雌雄间差异显著($P<0.05$), **表示差异极显著($P<0.01$).

Fig.1 Relative gonadal differentiation related gene expressions to tubulin between male and female PccF₁ offspring under laboratory culture condition
* stands for significant difference between the males and females ($P<0.05$), while ** stands for highly significant difference ($P<0.01$).

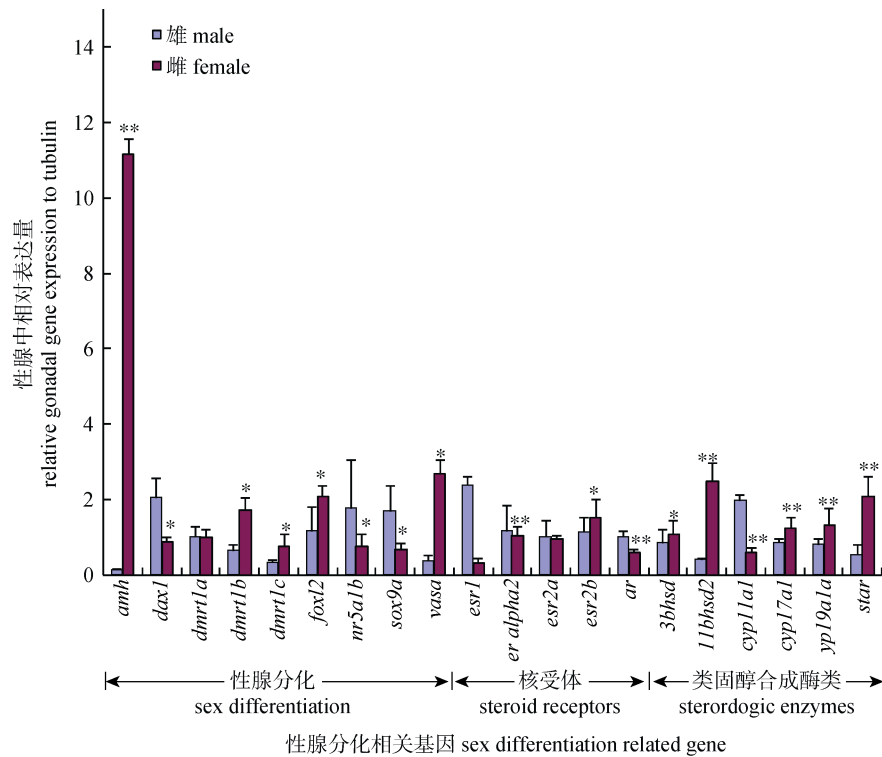


图 2 池塘养殖 PccF₁ 雌雄鱼性腺中性腺分化相关基因表达差异比较
*表示差异显著($P<0.05$), **表示差异极显著($P<0.01$).

Fig.2 Relative gonadal differentiation related gene expressions to tubulin between male and female PccF₁ offspring under pond culture condition
* stands for significant difference ($P<0.05$) between the males and females, while ** stands for highly significant difference ($P<0.01$).

3 讨论

性类固醇激素与鱼类雌雄鱼生长速度的差异相关^[8], 而且也证实性激素可能是尼罗罗非鱼雄鱼生长快于雌鱼的原因之一^[9]。一般来讲雄激素的作用较为明显^[8], 但在对黄金鲈(*Perca flavescens*)的研究中发现, 雄激素没有促进其生长的作用, 而雌激素通过提高食物摄入量促进雌鱼生长^[10]。本研究中雄鱼全重、全长和性体指标极显著低于雌鱼, 雌鱼有高于雄鱼的 GSI, 可以解释为雌鱼需要更多的代谢能量为繁殖做准备^[11]。卵黄蛋白原 vtg 和透明带蛋白 zp2 是在肝胰脏中合成并运送到性腺中发挥作用的, 雄鱼没有像雌鱼一样的卵巢用来储存卵黄蛋白原和透明带蛋白^[12], 造成了合成的蛋白在肝中的积累, 这与结果中雄鱼具有显著增高的 HSI 对应(数据未发表), 但是否和激素相关需要进一步的研究。

关于性腺发育相关基因在性腺维持中的作用已经引起了广泛的关注^[1]。之前的研究一直是以单个基因为基础进行研究的, 如 *amh*、*dax1*、*dmrt1*^[13]、*foxl2*、*NR5A1b*^[14]和 *sox9a*^[13]。在这些基因中 *sox9a* 能够结合 *NR5A1b* 上调 *amh* 表达^[14], 赛托利细胞分化的分子标志物(*sox9a*, *dmrt1*, *amh*)和精巢发育的标志物(*dax1*)都被证明能够抑制 *NR5A1/foxl2*-介导的 *cyp19a1a* 基因的转录和卵母细胞的发育^[1]。此外, *foxl2* 能够直接或间接调控 *NR5A1* 诱导 *Pcc-cyp19a1a* 的转录从而激活 E2 产生^[15], 但是目前在雌核发育物种中从分子生物学、激素水平研究基因的调控机制还鲜有报道^[16]。转录因子能参与期间芳香化酶活性的调控, 比如核受体 *nr5a*^[17]、*dax1*^[18]、*amh*、*dmrt1* 及 *foxl2*^[3, 15] 都能调控芳香化酶表达以及酶活力^[1]。到目前为止, 鱼类 *amh* 的功能尚未明确, 一般认为 *amh* 在两性鱼类的性别形成和功能维持中都能发挥作用^[19]。

环境因子如温度、水质和营养条件等能影响鱼类的性腺分化过程, 结合前期的研究^[1], 异育彭泽鲫的性腺分化期在 20 d 左右, 本研究中实验室和池塘养殖水温只是在冬季和春季存在较大差别, 而此时彭泽鲫性腺分化期已过。实验室养殖

组 7 g 左右的鱼虽性腺较小, 但能通过切片鉴别出雌雄鱼, 且雌雄鱼分别均处于各自发育的 I~II 期, 而池塘养殖雌鱼基本上处于 V 期或更后的时期, 精巢中能见到成熟精子和初级、次级精母细胞, 并有空泡状组织出现。本研究中实验室养殖 F₁ 雄鱼中性腺分化基因 *Pcc-dax1*, *Pcc-dmrt1a*, *Pcc-nr5a1b* 和 *Pcc-sox9a* 表达极显著高于雌鱼(图 1), 雄鱼类固醇合成酶类基因表达均极显著高于雌鱼。虽然鱼自身能够通过 HPG 轴自分泌和旁分泌作用来维持体内激素(E2/T)的平衡^[20], 但这样可能会导致 E2 合成减少^[14-15]。本研究中雌性化方向上的两个基因 *Pcc-foxl2* 和 *Pcc-cyp19a1a* 在实验室养殖 F₁ 雌雄鱼表达上却没有显著性变化, 推测其可能是通过激素反馈机制来进行调节的^[20]。再看池塘养殖 *PccF₁* 的雌雄差异(图 2), 池塘养殖雌鱼中的 *Pcc-ers1*、*Pcc-amh*、*Pcc-dmrt1s*、*Pcc-foxl2*、*Pcc-zp2* 表达以及类固醇合成相关基因(*Pcc-3bhsd*、*Pcc-11bhsd2*、*Pcc-cyp17a1*、*Pcc-cyp19a1a* 和 *Pcc-star*, 图 2)表达都出现了增高的趋势, 且极显著高于雄鱼中的水平。结果表明雌鱼类固醇合成增多, 与调控 *Pcc-cyp19a1a* 的转录因子(*Pcc-amh*、*Pcc-dmrt1s*、*Pcc-foxl2*)表达量增多相呼应。总之, 实验室和池塘养殖出现的雌雄鱼在性腺分化相关基因表达上的差异, 除了可能与雌核发育这种特殊的鱼类有关, 还可能会通过调控类固醇合成酶类及转录因子的表达进而影响内源性激素的合成, 进而改变雌雄鱼比例。已经有研究报道氨氮等水质指标和营养条件能改变鲫体内的激素水平从而影响性别比例^[21], 这从侧面说明内源性 E2 对于彭泽鲫性腺发育的重要性^[3, 15]。

参考文献:

- [1] Devlin R H, Nagahama Y. Sex determination and sex differentiation in fish: An overview of genetic, physiological, and environmental influences[J]. *Aquaculture*, 2002, 208(3-4): 191-364.
- [2] Li M H, Yang H H, Li M R, et al. Antagonistic roles of *Dmrt1* and *Foxl2* in sex differentiation via estrogen production in tilapia as demonstrated by TALENs[J]. *Endocrinology*, 2013, 154(12): 4814-4825.
- [3] Segner H, Casanova-Nakayama A, Kase R, et al. Impact of

- environmental estrogens on fish considering the diversity of estrogen signaling[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2013, 191: 190–201.
- [4] Wu G C, Tomy S, Lee M F, et al. Sex differentiation and sex change in the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegelii*[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2010, 167(3): 417–421.
- [5] Li M, Wang L, Wang H, et al. Molecular cloning and characterization of *amh*, *dax1* and *cyp19a1a* genes and their response to 17 α -methyltestosterone in Pengze crucian carp[J]. *Comp Biochem Physiol C*, 2013, 157(4): 372–381.
- [6] Zheng Y, Wang L, Li M, et al. Molecular characterization of five steroid receptors from pengze crucian carp and their expression profiles of juveniles in response to 17 α -ethinylestradiol and 17 α -methyl testosterone[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2013, 191: 113–122.
- [7] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta C_t$} method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408.
- [8] Mandiki S N M, Houbart M, Babiak I, et al. Are sex steroids involved in the sexual growth dimorphism in Eurasian perch juveniles?[J]. *Physiol Behav*, 2004, 80: 603–609.
- [9] Toguyeni A, Fauconneau B, Fostier A, et al. Influence of sexual phenotype and genotype, and sex ration on growth performances in tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Aquaculture*, 2002, 207(3–4): 249–261.
- [10] Simone D A. The effects of the synthetic steroid 17 α -methyltestosterone on the growth and organ morphology of the channel catfish (*Ictalurus punctatus*)[J]. *Aquaculture*, 1990, 84(1): 81–93.
- [11] Toguyeni A, Fauconneau B, Boujard T, et al. Feeding behaviour and food utilisation in tilapia *Oreochromis niloticus*: Effect of sex ratio and relationship with endocrine status[J]. *Physiol Behav*, 1997, 62(2): 273–279.
- [12] Mommsen T P, Walsh P J. Metabolic and enzymatic heterogeneity in the liver of the ureogenic teleost *Opsanus beta*[J]. *J Exp Biol*, 1991, 156: 407–418.
- [13] Kobayashi T, Kajiura-Kobayashi H, Guan G, et al. Sexual dimorphic expression of *DMRT1* and *Sox9a* during gonadal differentiation and hormone-induced sex reversal in the teleost fish Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Dev Dyn*, 2008, 237(1): 297–306.
- [14] von Hofsten J, Larsson A, Olsson P E. Novel steroidogenic factor-1 homolog (*ff1d*) is coexpressed with anti-Mullerian hormone (*AMH*) in zebrafish[J]. *Dev Dyn*, 2005, 233(2): 595–604.
- [15] Wang D S, Kobayashi T, Zhou L Y, et al. Foxl2 up-regulates aromatase gene transcription in a female-specific manner by binding to the promoter as well as interacting with ad4 binding protein/steroidogenic factor 1[J]. *Mol Endocrinol*, 2007, 21: 712–725.
- [16] Sun P, You F, Liu M X, et al. Steroid sex hormone dynamics during estradiol-17 β induced gonadal differentiation in *Paralichthys olivaceus* (Teleostei)[J]. *Chin J Oceanol Limnol*, 2010, 28(2): 254–259.
- [17] Zhang Y Y, Yuan C, Hu G, et al. Characterization of four *nr5a* genes and gene expression profiling for testicularsteroidogenesis-related genes and their regulatory factors in response to bisphenol A in rare minnow *Gobiocypris rarus*[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2013, 194(1): 31–44.
- [18] Martins R S, Power D M, Fuentes J, et al. DAX1 regulatory networks unveil conserved and potentially new functions[J]. *Gene*, 2013, 530(1): 66–74.
- [19] Klüver N, Pfennig F, Pala I, et al. Differential expression of anti-müllerian hormone(*amh*) and anti-müllerian hormone receptor type II (*amhrII*) in the teleost Medaka[J]. *Dev Dyn*, 2007, 236(1): 271–281.
- [20] Luckenbach J A, Yamamoto Y, Guzmán J M, et al. Identification of ovarian genes regulated by follicle-stimulating hormone (Fsh) *in vitro* during early secondary oocyte growth in coho salmon[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2013, 366(1): 38–52.
- [21] Sinha A K, Liew H J, Diricx M, et al. Combined effects of high environmental ammonia, starvation and exercise on hormonal and ion-regulatory response in goldfish (*Carassius auratus* L.)[J]. *Aquat Toxicol*, 2012, 114–115: 153–164.

Analysis of different gene expression profiles of sex differentiation-related genes between male and female pengze crucian carp (*Carassius auratus* var. *pengze*) under different culture modes

ZHENG Yao¹, CHEN Jiazhang¹, BING Xuwen¹, WANG Zaizhao²

1. Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences; Scientific Observing and Experimental Station of Fishery Resources and Environment in the Lower Reaches of the Changjiang River, Ministry of Agriculture; Key Open Laboratory of Ecological Environment and Resources of Inland Fisheries, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;
2. College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Yangling 712100, China

Abstract: Pengze crucian carp (*Carassius auratus* var. *pengze*, Pcc) is naturally gynogenic, and gynogenic Pcc produced by artificial breeding can theoretically produce solely female offspring. In laboratory culture, a higher proportion of male fish occurred in F₁ progenies compared with pond culture conditions. A higher proportion of males was found in the F₁ progeny under laboratory culture (43.6%) compared with pond (4.7%) conditions. To determine the cause of this variant sex ratio, ovarian gene expression profiles were detected and compared between the male and female F₁ progenies for different culture conditions. Results showed that expressions of most testicular sex differentiation-related, steroid receptor, and steroidogenic genes in PccF₁ offspring were significantly higher than those in ovaries under laboratory culture conditions, except for *Pcc-vasa*, *Pcc-esr1*, and *Pcc-esr2b*. With respect to pond culture conditions, expressions of most testicular sex differentiation-related and steroid receptor genes in PccF₁ offspring were significantly higher than those in ovaries, except for *Pcc-amh*, *Pcc-dmrt1b*, *Pcc-dmrt1c*, *Pcc-foxl2*, *Pcc-vasa*, and *Pcc-esr2b*. Amounts of the steroidogenic genes had reversed expression patterns (male<female). The gene expression profiles for steroidogenesis and transcriptional regulation of aromatase were different in the gonads of F₁ progenies between laboratory and pond culture conditions. The variant sex ratio may be attributed to the differential gene expression of both steroidogenic enzymes and transcription factors of aromatase under different culture densities, which may be associated with the regulation and/or synthesis of endogenous steroid hormone levels and related to different sex ratios.

Key words: gynogenesis; *Carassius auratus* var. *pengze*; sex differentiation; steroid receptor; steroidogenic enzyme; gene expression

Corresponding author: WANG Zaizhao. E-mail: zzwang@nwsuaf.edu.cn