

DOI: 10.12264/JFSC2020-0166

恒温高温调节对赤点石斑鱼幼鱼的生长、性腺发育以及 *gnrh*、*fsh β* 和 *lh β* 基因表达的影响

徐文刚¹, 唐永政¹, 张建柏², 真鍋颯一郎³, 征矢野清³, 邹华锋⁴

1. 烟台大学海洋学院, 山东 烟台 264005;

2. 烟台市海洋经济研究院, 山东 烟台 264003;

3. 长崎大学环中国东海环境资源研究所, 日本 长崎 851-2213;

4. 上海海洋大学水产科学国家级实验教学示范中心, 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306

摘要: 为了解恒定高温对赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*)生长和繁殖的影响, 以孵化后 120~420 日龄的幼鱼为研究对象, 对性腺发育以及与繁殖相关的基因 *gnrh*、*fsh β* 和 *lh β* 表达进行了研究。对照组为自然水温(13.2~27.1 °C)饲养, 实验组为 26 °C 恒温饲养。每隔 30 d 或 40 d 采样 1 次, 比较两组中鱼的体长、体重、性腺指数(GSI)、性腺发育情况以及 *gnrh*、*fsh β* 和 *lh β* 基因表达的差异。结果表明, 从 240 日龄开始, 实验组鱼的体长和体重均显著高于对照组($P<0.05$)。实验结束时, 实验组体长约为对照组的 1.3 倍, 体重约为对照组的 2 倍。对照组 GSI 一直维持在 0.25% 以下的低值, 实验组 GSI 在 330 日龄前处于 0.4% 以下, 但在 360 日龄时出现 GSI 1% 以上的个体。在 360、390 和 420 日龄的个体中, 实验组 GSI 显著高于对照组($P<0.05$)。实验结束时, 对照组中未检测到具有卵黄形成期卵母细胞的个体, 但实验组在 330、360 和 390 日龄出现了具有卵黄成熟期卵母细胞的个体。对照组和实验组间幼鱼脑中 *gnrh* 基因表达在各年龄段均无显著性差异($P>0.05$), 但脑垂体中 *fsh β* 表达在 360、390 和 420 日龄, *lh β* 在 390 和 420 日龄时, 实验组均显著高于对照组($P<0.05$)。研究表明, 26 °C 恒温调节不仅能促进赤点石斑鱼幼鱼体长、体重和 GSI 的增加, 同时也能显著提高脑垂体中 *fsh β* 和 *lh β* 基因含量, 从而加速性腺发育成熟。

关键词: 赤点石斑鱼; 幼鱼; 恒温高温; 生长; 性腺发育; *gnrh*; *fsh β* ; *lh β*

中图分类号: S965

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2021)01-0019-10

硬骨鱼类性腺发育成熟以及排卵或排精主要受到下丘脑-垂体-性腺轴为中心的内分泌系统和外界环境因子的综合影响^[1]。鱼类受到光照和水温等环境因子的刺激后, 在下丘脑合成促性腺激素释放激素(gonadotropin-releasing hormone, GnRH), GnRH 诱导垂体合成促性腺激素(gonadotropins, GtHs), GtHs 中的 β 亚基单元有两种类型: 促卵泡激素(follicle stimulating hormone, FSH β)和黄体生成素(luteinizing hormone, LH β)^[1]。已有研究表明,

多数鱼类性分化、性发育以及性成熟过程中, 都受到 GnRH-GtHs-性腺轴的调控, 其中 FSH β 和 LH β 基因起着关键作用^[2-5]。

赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*)俗名为石斑、红斑, 隶属为辐鳍鱼纲(Actinopterygii)、鲈形目(Perciformes)、鲈亚目(Percoidae)、鲈科(Serranidae)、石斑鱼属, 是一种名贵的岛礁性经济鱼类, 广泛分布于我国东海、南海以及印度、日本和朝鲜沿岸^[6-7]。赤点石斑鱼属于雌雄同体, 先雌后雄型的

收稿日期: 2020-06-04; 修订日期: 2020-07-26.

基金项目: 山东省农业重大应用技术创新项目(SD2019YY003); 日本学术振兴会(JSPS)研究项目(26660173); 烟台大学博士科研启动基金(HX20B29).

作者简介: 徐文刚(1985-), 男, 博士, 讲师, 从事海水鱼类繁殖生理学研究. E-mail: xugang@ytu.edu.cn

通信作者: 邹华锋, 讲师, 从事鱼类应激生理学研究. E-mail: hfzou@shou.edu.cn

海水鱼类, 孵化后 100~120 日龄性腺分化为雌性^[8-9], 5~6 龄时通过性逆转变为雄性^[10]。近年来, 为了获得更多的雄性亲本, 大量的研究集中在利用外源雄激素人工诱导雌性逆转为雄性的研究上^[11-12]。但由于人工性逆转存在不稳定因素, 许多雄性不久后又恢复为雌性, 导致无法运用于生产实践, 成为限制石斑鱼苗种产业发展的一大瓶颈。目前, 国内有关赤点石斑鱼的研究主要集中在生长、发育、成熟、产卵和孵化^[13-14]以及杂交子代的胚胎发育^[15]和人工繁殖过程中存在的问题^[16]等。

作为东海和南海的地域性鱼类, 赤点石斑鱼是理想的增殖放流鱼类, 因此开展其人工繁殖和育苗技术的研究具有重要的理论意义和实践价值^[17]。但目前赤点石斑鱼人工繁殖技术尚未完全成功, 养殖所需的苗种主要依靠天然采捕, 极大限制了人工养殖的规模。为解决人工苗种产量不足的问题, 日本山口县从 2003 年开始对赤点石斑鱼人工苗种的开发和放流技术进行了大量的研究^[18]。赤点石斑鱼的生长较其他石斑鱼慢, 需要 4~5 年其体重才能达到 400~500 g 的上市规格, 所以现行的常规养殖方法无法让其早日上市获利^[18]。研究表明, 人工养殖条件下环境因子如光照和水温是调节鱼类生长发育和性成熟的关键因子^[19]。韩国学者 Cho 等^[20]和 Oh 等^[21]报道赤点石斑鱼生长适宜的水温为 24~28 ℃。此外, 以往的研究表明日本长崎市所在的东海海域水温变化为 13~28 ℃^[8], 而在秋冬季节水温较低的环境下, 赤点石斑鱼的生长会停滞^[22]。因此, 本研究通过比较在自然海水水温和 26 ℃恒温养殖条件下, 赤点石斑鱼幼鱼的生长、性腺发育以及脑和脑垂体中 *gnrh*、*fsh β* 和 *lh β* 基因表达的差异, 探讨养殖过程中变温和恒温高温对其生长发育的影响及其原因, 以期对未来工业化成鱼的大规模培育提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

2018 年 6 月在日本山口县水产研究所对赤点石斑鱼亲鱼进行培育和催产、人工受精和苗种孵化。2018 年 9 月 20 日, 取 600 尾孵化后 90 日龄的幼鱼, 有氧运输至长崎大学中国东海环境资源

研究所, 暂养在两个 500 L 水槽中, 每个水槽放置 300 尾幼鱼, 1 个月后将开始实验。

1.2 实验设计

实验分为两组, 对照组赤点石斑鱼为自然水温饲养并每天记录下海水水温, 实验组用温度调节器维持在 26 ℃恒温饲养。水槽均为循环海水和自然光照, 并配置增氧系统。如表 1 所示, 实验时间从 2018 年 10 月至 2019 年 8 月, 根据幼鱼性腺发育的程度, 每隔 30 d 或 40 d 采样一次。采样鱼的年龄分别为 120、160、200、240、270、300、330、360、390 和 420 日龄, 每次采样数量为每组各 12 尾, 其中 120 日龄为对照组和实验组鱼的起始采样时间。实验期间对照组和实验组水温见表 1。实验期间每天早晚各投食一次, 观察鱼的摄食情况并记录下每日的摄食量, 所用饲料如下: 120 至 200 日龄: Ohitome EP2 (日清丸红饲料, 日本); 200 至 420 日龄: EP3。实验期间个体死亡率少于 10%。

表 1 实验期间对照组和实验组海水水温

Tab. 1 The seawater temperature of the control group and the experimental group during the trial

采样日期 sampling date	日龄 dph	水温/℃ water temperature	
		对照组 control group	实验组 experimental group
10/19	120	25.9	26.0
12/2	160	17.7	26.0
1/11	200	15.2	26.0
2/23	240	13.2	26.0
3/20	270	14.5	26.0
4/20	300	16.3	26.0
5/22	330	19.8	26.0
6/27	360	20.5	26.0
7/21	390	25.6	26.0
8/21	420	27.1	26.0

注: dph 表示孵化后天数。

Note: dph means days post hatching.

1.3 采样方法

采样前一天对幼鱼进行禁食处理, 采样时使用苯氧乙醇将鱼麻醉, 测量其体长和体重后取出性腺, 测定重量后将其立即置于波恩试剂中固定 24 h 后, 于 70% 的乙醇中保存用于组织学分析。性腺指数(gonadosomatic index, GSI)的计算公式如下:

GSI(%) = (性腺重/体重) × 100。

随后打开头盖骨, 取下脑和脑垂体。将脑短暂保存于液氮后转移至 -80 °C 冰箱中长期保存, 脑垂体保存在 RNAlater 试剂(Ambion Inc., Invitrogen Life Technologies, Japan)中后于 4 °C 低温保存, 一周后废弃 RNAlater, 转移至 -80 °C 冰箱中长期保存用于分子生物学分析。

1.4 生殖腺的组织学观察

组织学分析步骤参照 Shein 等^[23]的方法, 对石斑鱼性腺进行常规梯度酒精脱水、二甲苯透明、石蜡包埋和连续切片, 厚度为 5 μ m。采用苏木精-伊红(HE)染色, 中性树胶封片, Olympus FX380 型光学显微镜观察并拍照, 以各个体中卵母细胞最发达阶段为生殖腺的发育阶段。参照国内外学者^[24-27]的方法对性腺发育分期和描述如下:

(A) 卵原细胞增殖期(oogonial stage, Og): 卵巢腔已经完全形成, 性腺分化为雌性, 卵原细胞内具有大的细胞核且被薄的细胞质所包围。

(B) 染色核仁期(chromatin nucleolus stage, Cn): 处于卵原细胞和核仁外周期卵母细胞发育的过渡阶段, 非常短暂, 细胞核被薄的细胞质所围绕, 内有小的核仁。

(C) 核仁外周期(perinucleolus stage, Pn): 细胞体积小; 细胞质少, 显强嗜碱性; 核仁 1~2 个, 分布在核的中央或边缘。细胞质被苏木精染色深, 核呈现巨大化, 核中出现很多小的核仁。

(D) 初级卵黄期(primary yolk stage, Py): 细胞质中开始出现卵黄球, 被伊红染色较深。

(E) 次级卵黄期(secondary yolk stage, Sy), 大生长期: 核周细胞质出现油滴, 环形带状分布, 并向胞质边缘扩散; 双层滤泡膜。卵母细胞快速生长, 卵黄球迅速累积, 占细胞质的大半。

(F) 三级卵黄期(tertiary yolk stage, Ty), 大生长期晚期: 卵黄颗粒形成, 油滴增多, 逐渐充满细胞质。细胞质中已经积累了大量卵黄, 但是核移动还未开始。

1.5 赤点石斑鱼脑中 *gnrh* 以及脑垂体中 *fsh β* 和 *lh β* 基因的测定

1.5.1 总 RNA 的提取与反转录反应 取冻存的赤点石斑鱼各组织, 参照 TRIzol 试剂盒(Life

Technologies Corp., USA)中的说明书进行总 RNA 的提取, 经 1% 琼脂凝胶电泳检测 RNA 完整度, 用 NanoDrop 2000 分光光度计(Thermo Scientific Inc., USA)检测 RNA 浓度。

根据 Transcriptor first strand cDNA synthesis (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany)说明书操作, 取 2 μ g 赤点石斑鱼脑和 150 ng 脑垂体总 RNA 为反转录模板合成第一链 cDNA, 用于 PCR 的扩增。

1.5.2 *gnrh*、*fsh β* 和 *lh β* 基因实时荧光定量的检测 *gnrh*、*fsh β* 和 *lh β* 的测定方法参照本实验室已发表论文^[8]中的描述如下: 根据 GenBank 中赤点石斑鱼 *gnrh* (MF092862)、*fsh β* (LC102809)和 *lh β* (LC102810)基因序列设计荧光定量引物。*gnrh* 引物用 Primer3Plus 软件设计, 由 Fasmac 公司(Kanagawa, Japan)合成。*fsh β* 和 *lh β* 引物用 Primer Express 软件设计, 由 Integrated DNA Technologies 公司(USA)合成, 引物序列如表 2 所示。

gnrh 基因测定参照 FastStart Essential DNA Green Master (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)试剂盒上的说明书操作, PCR 反应体系: cDNA 模板 1 μ L, 5 μ L Green Master (2× concentrate), 上下游引物(10 pmol/ μ L)各 1 μ L, 2 μ L 灭菌超纯水, 总计 10 μ L 混合物。在 Light Cycler[®] 480(Roche Diagnostics, Switzerland)进行 PCR 反应, 条件如下: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 10 s, 55 °C 退火 10 s, 72 °C 延伸 10 s, 45 个循环; 95 °C 5 s, 65 °C 1 min 熔解; 最后 50 °C 冷却 30 s。

fsh β 和 *lh β* 基因测定参照 FastStart Essential DNA Probe Master(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)试剂盒上的说明书操作, PCR 反应体系: cDNA 模板 2.5 μ L, 5 μ L Probe Master (2× concentrate), 探针引物(primer F 10 pmol/ μ L, primer R 10 pmol/ μ L, probe 5 pmol/ μ L) 0.5 μ L, 2 μ L 灭菌超纯水, 总计 10 μ L 混合物。在 Light Cycler[®] 480 进行 PCR 反应, 条件如下: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 15 s, 60 °C 延伸 1 min, 45 个循环; 95 °C 5 s, 65 °C 1 min 熔解; 最后 50 °C 冷却 30 s。PCR 反应后获得熔解曲线, 检测数据用绝对定量法进行统计分析。

表 2 实时荧光定量 PCR 反应中引物序列
Tab. 2 Sequences of primers for quantitative real-time PCR

基因 gene		核苷酸序列(5'-3') primer sequence (5'-3')	扩增长度/bp amplicon	扩增效率 amplification efficiency
<i>gnrh</i>	forward	CCACTGTCAGCACTGGTCAT	60	1.964
	reverse	AGGCTGTCCAGATCCCTCTT		
<i>fshβ</i>	forward	CTGCCACTCCGACTGTCATC	101	1.985
	probe	ACCAGCATCAGCATCCCTGTGGAGA		
<i>lhβ</i>	reverse	GGTAACACTGTCCTTCACATATGG	115	1.981
	forward	TTTGAGCTTCCTGACTGTCCTC		
	probe	ACCCGACTGTCACCTACCCTGTGGC		
	reverse	GGCTCTCGAAGGTGCAGTC		

注: forward 表示正向引物; reverse 表示反向引物; probe 表示探针引物。
Note: forward represents forward primer; reverse represents reverse primer; probe represents probe primer.

1.6 数据分析

利用 SPSS 22.0 软件对数据进行比较分析, 所有数据用平均值±标准误 ($\bar{x} \pm SE$) 表示。采用 Kolmogorov-Smirnov 法进行正态分布检测, 利用 *T* 检验(independent samples *T*-test)或 ANOVA 检验以及 Tukey’s HSD 法进行差异性比较分析, 取 $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 对照组和实验组中赤点石斑鱼幼鱼体长、体重和性腺指数的差异

如表 3 所示, 两组中鱼的体长和体重都随着年龄增长而增加, 但实验组较对照组增加更明显; 尤其从 240 日龄开始, 实验组的体长和体重均显

著高于对照组($P < 0.05$)。从实验开始到结束, 对照组中鱼的体长增加约 67 mm, 体重增加约 54 g; 实验组鱼的体长增加约 105 mm, 体重增加约 115 g。实验结束时, 实验组鱼的体长约是对照组的 1.3 倍, 体重约是对照组的 2 倍。对照组中鱼的体长和体重在 360、390 和 420 日龄显著高于 120~330 日龄($P < 0.05$)。实验期间, 实验组鱼的体长和体重逐渐显著增加。

对照组 GSI 一直维持在 0.25%以下的低值, 实验组 GSI 在 330 日龄前处于 0.4%以下; 在 360、390 和 420 日龄时上升至 0.5%~1%之间, 且在 360 日龄时出现了 1%以上的个体。在 360、390 和 420 日龄, 实验组 GSI 显著高于对照组($P < 0.05$) (表 3)。

表 3 对照组和实验组中赤点石斑鱼幼鱼的体长、体重以及性腺指数的变化
Tab. 3 The changes of total length, body weight and gonadal somatic indexes of control group and experimental group of *Epinephelus akaara* $n = 12; \bar{x} \pm SE$

日龄 dph	体长/mm	total length	体重/g	body weight	性腺指数/%	gonadal somatic index
	对照组 CG	实验组 EG	对照组 CG	实验组 EG	对照组 CG	实验组 EG
120	90.63±2.08 ^a	90.63±2.08 ^A	13.41±0.92 ^a	13.41±0.92 ^A	0.08±0.01 ^{ab}	0.08±0.11 ^A
160	97.33±3.75 ^{ab}	105.25±2.44 ^B	15.51±1.53 ^a	18.04±1.14 ^A	0.09±0.01 ^{ab}	0.11±0.02 ^A
200	99.83±1.62 ^{abc}	117.17±2.02 ^C	15.79±0.65 ^a	23.38±1.17 ^{AB}	0.12±0.02 ^a	0.11±0.03 ^A
240	101.60±5.16 ^a	133.71±3.81 ^{D*}	16.30±1.87 ^a	39.91±2.88 ^{BC*}	0.16±0.03 ^{ab}	0.16±0.02 ^A
270	104.00±1.26 ^{abc}	140.13±3.30 ^{D*}	17.53±0.54 ^a	44.39±2.54 ^{C*}	0.08±0.01 ^a	0.17±0.04 ^A
300	110.83±3.16 ^{bc}	151.00±4.06 ^{E*}	21.56±1.82 ^a	53.49±3.93 ^{C*}	0.13±0.04 ^{ab}	0.24±0.02 ^{AB}
330	114.50±2.78 ^c	158.29±2.12 ^{E*}	24.74±2.28 ^a	57.97±2.24 ^{C*}	0.11±0.02 ^{ab}	0.35±0.04 ^{AB}
360	137.86±3.60 ^d	174.25±5.64 ^{F*}	45.07±1.27 ^b	80.80±5.71 ^{D*}	0.11±0.02 ^{ab}	1.09±0.35 ^{C*}
390	152.75±3.13 ^{de}	188.70±3.20 ^{G*}	58.04±3.47 ^c	109.24±7.27 ^{E*}	0.13±0.02 ^{ab}	0.88±0.23 ^{BC*}
420	157.83±3.75 ^e	195.75±3.10 ^{G*}	67.95±5.74 ^c	128.68±9.05 ^{F*}	0.22±0.03 ^b	0.50±0.07 ^{ABC*}

注: 同列中标有不同大小写字母者表示各日龄间有显著性差异($P < 0.05$), 标有相同大小写字母表示各日龄间无显著性差异($P > 0.05$), * 表示实验组与对照组间有显著性差异($P < 0.05$)。

Note: CG, control group; EG, experimental group. The data with different capital or lower-case letters in the same column are significantly different at 0.05 probability level between different dphs. The same capital or lower-case letters indicate no significant differences at 0.05 probability level, and * means significant difference between the experimental group and the control group ($P < 0.05$).

2.2 对照组和实验组中幼鱼性腺发育情况的比较

对照组和实验组中幼鱼性腺发育各阶段如图 1 所示, 两组间幼鱼性腺发育不同阶段生殖细胞占比例的变化如图 2 所示。在 120 日龄的个体中, 卵巢腔的形成和卵原细胞(Og)的出现标志着幼鱼性腺已经分化为雌性(图 1a)。对照组在 160 日龄的个体中检测到染色核仁期(Cn)卵母细胞(图 1b); 200~270 日龄的个体中, Cn 逐渐发育为核仁外周期(Pn)卵母细胞(图 1c); 300~420 日龄的个体中,

Pn 期卵母细胞直径增加, 占卵巢组织的大部分。实验结束时, 对照组中尚未检测到卵黄形成期卵母细胞的个体。实验组在 160 日龄的个体中检测到 Cn 和 Pn 期卵母细胞(图 1, b 和 c); 200~300 日龄的个体中, 其发育阶段均检测为 Pn 期卵母细胞(图 1c); 330 日龄的个体中开始出现初级卵黄期(Py)卵母细胞(图 1d), 其个体比例为 9.1%; 360 日龄的个体中开始出现次级卵黄期(Sy)卵母细胞(图 1e), 其个体比例为 37.5%; 390 日龄的个体中开始

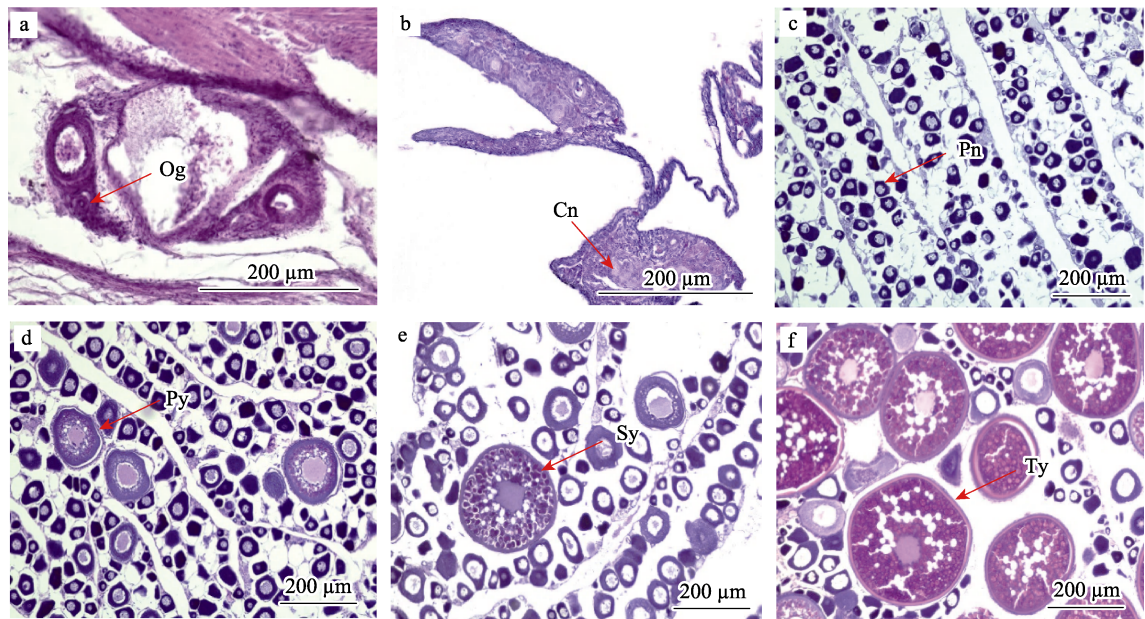


图 1 赤点石斑鱼性腺在不同发育阶段的切片图

a. 卵原细胞; b. 染色核仁期; c. 核仁外周期; d. 初级卵黄期; e. 次级卵黄期; f. 三级卵黄期.

Fig. 1 Histological sections of *Epinephelus akaara* at different gonadal developmental stages

a. oogonial stage, Og; b. chromatin nucleolus stage, Cn; c. peri-nucleolus stage, Pn; d. primary yolk stage, Py; e. secondary yolk stage, Sy; f. tertiary yolk stage, Ty.

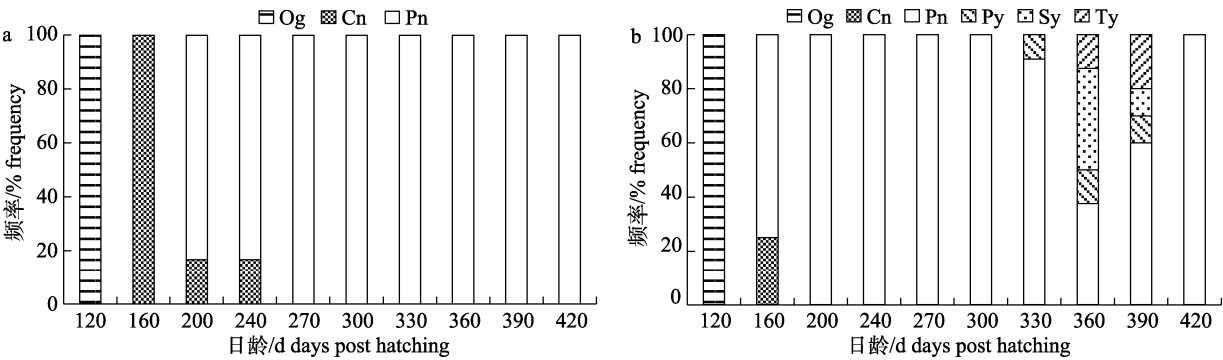


图 2 对照组和实验组赤点石斑鱼性腺中不同发育阶段生殖细胞所占比例的变化

a. 对照组; b. 实验组. Og: 卵原细胞; Cn: 染色核仁期; Pn: 核仁外周期; Py: 初级卵黄期; Sy: 次级卵黄期; Ty: 三级卵黄期.

Fig. 2 The changes in the percentage of different gonadal developmental stage germ cells of *Epinephelus akaara* between the control group and experimental group

a. control group; b. experimental group. Og: oogonial stage; Cn: chromatin nucleolus stage; Pn: peri-nucleolus stage; Py: primary yolk stage; Sy: secondary yolk stage; Ty: tertiary yolk stage.

出现三级卵黄期(Ty)卵母细胞(图 1f), 其个体比例 20%; 但在 420 日龄的个体中未检测到卵黄形成期卵母细胞, 只有 Pn 期卵母细胞(图 1c)。

2.3 对照组和实验组幼鱼脑中 *gnrh* 以及脑垂体中 *fshβ* 和 *lhβ* 基因表达的差异

对照组和实验组中幼鱼脑中 *gnrh* 以及脑垂体中 *fshβ* 和 *lhβ* 基因表达的差异如图 3 所示。对照组中 *gnrh* 基因含量在 270 日龄显著高于其他日龄

段($P<0.05$); 实验组中 *gnrh* 含量在 240 和 270 日龄显著高于 120、160 和 330 日龄($P<0.05$)。此外, 两组间 *gnrh* 含量在各日龄段均无显著性差异($P>0.05$)。

对照组中 *fshβ* 基因含量在 160 日龄显著高于其他日龄段($P<0.05$), 实验组中 *fshβ* 含量在 420 日龄显著高于 200、240、270 和 330 日龄($P<0.05$)。此外, 在 360、390 和 420 日龄, 实验组中 *fshβ* 含量显著高于对照组($P<0.05$)。对照组中 *lhβ* 基因含量在 300 日龄显著高于 420 日龄($P<0.05$), 实验组中 *lhβ* 含量在各日龄段均无显著性差异($P>0.05$)。在 390 和 420 日龄, 实验组中 *lhβ* 含量显著高于对照组($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 水温对赤点石斑鱼幼鱼生长的影响

本实验对照组和实验组中赤点石斑鱼幼鱼体长和体重的增速在 160 日龄以后出现明显差异性。对照组中由于冬季和春季水温较低, 幼鱼摄食量从 12 月(160 日龄)到 5 月(330 日龄)一直较少, 体长和体重增加不明显; 而实验组中由于冬春季期间通过持续加温, 体长和体重增加明显, 在 5 月(330 日龄)时实验组较对照组体长增加约 40 mm, 体重增加约 30 g。然而从水温超过 20 °C 的 6 月(360 日龄)开始, 对照组中鱼的体长和体重开始显著增加, 表明水温对赤点石斑鱼幼鱼的生长具有较大影响。kayano 等^[22]报道在水温下降到 17~18 °C 以下时, 赤点石斑鱼的生长可能停滞。本实验中得到相同的结果, 对照组幼鱼在 160~330 日龄时可能由于水温过低而引起摄食量下降, 新陈代谢缓慢, 最终导致体长和体重增加不明显。

3.2 水温对赤点石斑鱼幼鱼性腺发育成熟度的影响

本实验中两组幼鱼性腺发育程度有很大差异。实验期间, 对照组中未观察到成熟阶段卵黄形成期的个体, 只有未成熟核仁外周期(Pn)卵母细胞的个体。而实验组中由于水温一直维持在 26 °C, 在 5 月(330 日龄)时观察到卵黄形成期成熟的个体, GSI 为 0.35%; 且在 6 月(360 日龄)时一些个体的 GSI 达到最高为 1%。研究表明, 赤点石斑鱼自然产卵的时间在 6—7 月^[28], 其初回成熟年龄在 2 龄,

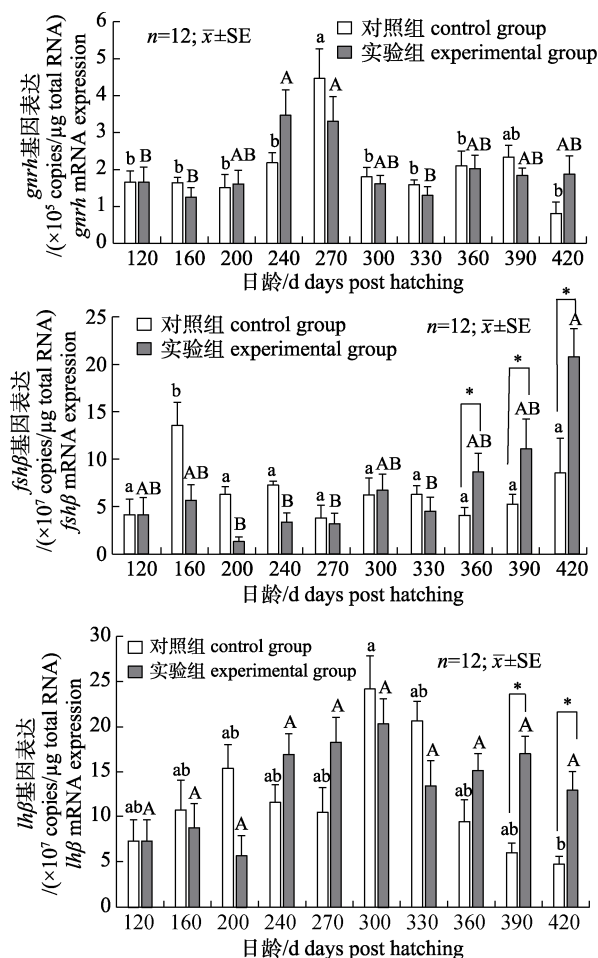


图 3 对照组和实验组中赤点石斑鱼 *gnrh*、*fshβ* 和 *lhβ* 基因表达的差异

图中标有不同小写字母者表示对照组间有显著性差异($P<0.05$), 标有不同大写字母者表示实验组间有显著性差异($P<0.05$), *表示实验组与对照组间有显著性差异($P<0.05$)。

Fig. 3 The differences of *gnrh*, *fshβ* and *lhβ* gene expression of *Epinephelus akaara* between the control group and experimental group

Different lower-case letters indicate significant difference at 0.05 probability level among the control groups, and different capital letters indicate significant difference at 0.05 probability level among the experimental groups, and the * represents significant difference at 0.05 probability level between the control and experimental groups.

平均体长为 217 mm^[22]。本实验实验组中出现性成熟的幼鱼在 7 月(390 日龄)时平均体长为 190 mm, 与 kayano^[22]报道的 217 mm 成熟体长虽有差距, 但很接近, 而对照组幼鱼在 7 月仅为 150 mm。因此实验组中出现的成熟个体可能由于一直维持在高水温而提前达到了性成熟所需要的积温、营养和体长所致。

实验组中观察到处于成熟阶段卵黄形成期(Py、Sy 和 Ty)的个体, 卵母细胞中蓄积了大量的卵黄, 但未观察到 Ty 时期以后卵母细胞的个体。此外, 420 日龄时所有个体的性腺都处于 Pn 阶段, GSI 也呈现低值, 仅为 0.5%。360 和 390 日龄时幼鱼卵母细胞虽然已经完成了卵黄蓄积, 为下一步产卵作准备, 但最终却无法排卵, 成为退行阶段卵母细胞。由于石斑鱼是雌性先熟的鱼种, 所以在初次成熟的过程中, 种群中不会出现雄性。而本实验成熟个体中积存了大量卵黄却无法排卵, 其原因可能由于组群中缺乏雄性所致。点带石斑鱼(*E. malabaricus*)在雌雄混合饲养环境下能够自然产卵, 但在只有雌性单独饲养的条件下, 卵黄虽然蓄积完成却无法排卵^[29]。以往的研究也表明在雌性蜂巢石斑鱼(*E. merra*)的水体中, 如果通过持续注入饲养成熟雄鱼水槽中的水, 雌鱼最终也能发育成熟并顺利排卵; 但如果没有注入饲养成熟雄鱼水槽中的水, 雌鱼虽然完成了卵黄的蓄积, 但最终却无法排卵^[30]。本研究结果与上述实验现象一致, 表明赤点石斑鱼雌鱼最终能成熟并排卵的条件之一可能是在水体中需要有雄鱼或者雄性激素刺激的存在。本实验中虽然通过加温进行成熟诱导而使雌性成熟, 但最终却无法排卵, 推测其原因可能是由于缺乏雄性所致。因此本研究结果提供以下可能性: 赤点石斑鱼种群中雄鱼的存在可能诱导雌鱼排卵, 这是作为雄性功能性存在的意义。今后在赤点石斑鱼的养殖过程中, 如果能够利用高水温诱导功能性的雌雄鱼, 可能为人工赤点石斑鱼的苗种生产带来极大的便利。

3.3 水温对赤点石斑鱼 *gnrh*、*fsh β* 和 *lh β* 基因表达的影响

本实验中, 对照组和实验组间赤点石斑鱼脑中 *gnrh* 基因含量无显著性差异; 但脑垂体中 *fsh β*

在 360、390 和 420 日龄, *lh β* 在 390 和 420 日龄时, 实验组均显著高于对照组。在欧洲鲈(*Dicentrarchus labrax*)同年龄段的雄鱼中, 从未成熟期到产卵期, *fsh β* 和 *lh β* 基因表达在生长快的鱼中显著高于生长慢的鱼, 表明 *fsh β* 和 *lh β* 基因与鱼类生长和繁殖密切相关^[31]。已有大量研究表明, 在鲑^[32-33]、日本海鳗(*Conger myriaster*)^[34]、日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)^[35]和欧洲鲈^[36]中, *fsh β* 主要用于调节早期的卵子发生或精子发生阶段, 而 *lh β* 的主要功能在于促进性腺发育成熟并最终诱导排卵或排精。本研究结果表明, 在赤点石斑鱼中 *fsh β* 和 *lh β* 可能协同作用于性腺发育成熟。

此外, 在 Oh 等^[21]的研究中, 28 °C 高水温能够提前诱导赤点石斑鱼性腺发育成熟, 成熟时其 *fsh β* 和 *lh β* 基因含量显著高于自然水温和 20 °C 恒温条件。本实验中的结果与上述结论一致, 表明恒温 26 °C 条件下亦可诱导赤点石斑鱼性腺提前发育成熟, 其可能原因是在成熟阶段脑垂体中 *fsh β* 和 *lh β* 基因含量显著增加所致。在 Oh 等^[21]的研究中, 24 °C 恒温可能由于积温不够导致幼鱼成熟率不高, 而 28 °C 恒温可能导致能源浪费或因持续高温导致幼鱼缺氧死亡率高等因素。因此本研究结果表明, 在今后赤点石斑鱼工厂化养殖过程中, 综合考虑积温和能源等因素, 恒温 26 °C 条件下可能更有利于促进其生长、性腺发育和成熟。

参考文献:

- [1] Wei H, Wu Y. Fish Physiology[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2014: 253-288. [魏华, 吴垠. 鱼类生理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2014: 253-288.]
- [2] Miranda L A, Strüssmann C A, Somoza G M. Immunocytochemical identification of GtH1 and GtH2 cells during the temperature-sensitive period for sex determination in pejerrey, *Odontesthes bonariensis*[J]. General and Comparative Endocrinology, 2001, 124(1): 45-52.
- [3] Wong T T, Zohar Y. Novel expression of gonadotropin subunit genes in oocytes of the gilthead seabream (*Sparus aurata*)[J]. Endocrinology, 2004, 145(11): 5210-5220.
- [4] Wu Y S, He Z, Zhang L H, et al. Ontogeny of immunoreactive Lh and Fsh cells in relation to early ovarian differentiation and development in protogynous hermaphroditic rice-field eel *Monopterus albus*[J]. Biology of Reproduction,

- 2012, 86(3): Article 93.
- [5] Shimizu A, Hamaguchi M, Ito H, et al. Appearances and chronological changes of mummichog *Fundulus heteroclitus* FSH cells and LH cells during ontogeny, sexual differentiation, and gonadal development[J]. General and Comparative Endocrinology, 2008, 156(2): 312-322.
- [6] Ai H, Wu T J, Li Y Z, et al. Optimum stocking densities of red spotted grouper *Epinephelus akaara* in net cages: Determination by production function[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2000, 7(4): 42-46. [艾红, 巫特坚, 李永振, 等. 应用生产函数确定网箱养殖赤点石斑鱼最佳放养密度[J]. 中国水产科学, 2000, 7(4): 42-46.]
- [7] Rimmer M, Phillips M J, Sim S Y. Aquaculture of groupers in Asia and the Pacific[C]//Johnston B, Yeeting B. Economics and Marketing of the Live Reef Fish Trade in Asia-Pacific. Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research, 2006: 116-134.
- [8] Xu W G, Manabe S, Mushirobira Y, et al. Changes in expression of reproduction-related hormones in the brain and pituitary during early ovarian differentiation and development in the red spotted grouper *Epinephelus akaara*, with emphasis on FSH β and LH β [J]. Aquaculture, 2020, 514: 734497.
- [9] Kim H K, Kim J H, Baek H J, et al. Gene expression of aromatases, steroid receptor, GnRH and GTHs in the brain during the formation of ovarian cavity in red spotted grouper, *Epinephelus akaara*[J]. Development & Reproduction, 2016, 20(4): 367-377.
- [10] Kim H K, Kim J H, Kim W S, et al. Early gonadal differentiation of the protogynous red spotted grouper, *Epinephelus akaara*[J]. Development & Reproduction, 2015, 19(4): 209-215.
- [11] Li G L, Liu X C, Zhang Y, et al. Gonadal development, aromatase activity and P450 aromatase gene expression during sex inversion of protogynous red-spotted grouper *Epinephelus akaara* (Temminck and Schlegel) after implantation of the aromatase inhibitor, fadrozole[J]. Aquaculture Research, 2006, 37(5): 484-491.
- [12] Li G L, Liu X C, Lin H R. Effects of aromatizable and non-aromatizable androgens on the sex inversion of red-spotted grouper (*Epinephelus akaara*)[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2006, 32(1): 25-33.
- [13] Wang H S, Fang Q S, Zheng L Y. Morphological development and growth of the larvae, juveniles and young fish of *Epinephelus akaara*[J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2001, 10(4): 307-312. [王涵生, 方琼珊, 郑乐云. 赤点石斑鱼仔稚幼鱼的形态发育和生长[J]. 上海水产大学学报, 2001, 10(4): 307-312.]
- [14] Ye P, Cai H C, Xu M H, et al. Effects of different culturing methods on broodstock maturing, spawning and larval hatching of *Epinephelus akaara*[J]. Marine Fisheries, 2006, 28(3): 201-205. [叶鹏, 蔡厚才, 许明海, 等. 不同培育方式对赤点石斑鱼成熟、产卵和孵化的影响[J]. 海洋渔业, 2006, 28(3): 201-205.]
- [15] Yang Q H, Huang Z C, Zheng L Y, et al. Embryonic development and growth of hybrid from the hybridization of *Epinephelus moara* (♀) $\times$ *E. akaara* (♂)[J]. Marine Fisheries, 2014, 36(3): 224-231. [杨求华, 黄种持, 郑乐云, 等. 云纹石斑鱼(♀) $\times$ 赤点石斑鱼(♂)杂交子代胚胎发育及生长[J]. 海洋渔业, 2014, 36(3): 224-231.]
- [16] Wang H S. The problems and situation in the artificial propagation of grouper, *Epinephelus*[J]. Journal of Dalian Fisheries University, 1997, 12(3): 44-51. [王涵生. 石斑鱼 *Epinephelus* 人工繁殖研究的现状与存在问题[J]. 大连水产学院学报, 1997, 12(3): 44-51.]
- [17] Okumura S, Okamoto K, Oomori R, et al. Spawning behavior and artificial fertilization in captive reared red spotted grouper, *Epinephelus akaara*[J]. Aquaculture, 2002, 206(3-4): 165-173.
- [18] Nambu T. Seed production and aquaculture technology of red spotted grouper *Epinephelus akaara*[J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 2014, 80(6): 1000.
- [19] Bapary M A J, Takemura A. Effect of temperature and photoperiod on the reproductive condition and performance of a tropical damselfish *Chrysiptera cyanea* during different phases of the reproductive season[J]. Fisheries Science, 2010, 76(5): 769-776.
- [20] Cho H C, Kim J E, Kim H B, et al. Effects of water temperature change on the hematological responses and plasma cortisol levels in growing of red spotted grouper, *Epinephelus akaara*[J]. Development & Reproduction, 2015, 19(1): 19-24.
- [21] Oh S B, Lee C H, Lee Y D. Induction of puberty in red spotted grouper, *Epinephelus akaara* by water temperature[J]. Journal of Aquaculture Research & Development, 2018, 9(5): 1000537.
- [22] Kayano Y, Oda T. Growth and spawning of red spotted grouper, *Epinephelus akaara*, under artificial rearing condition[J]. Suisan Zoshoku, 1994, 42(3): 419-425.
- [23] Shein N L, Chuda H, Arakawa T, et al. Ovarian development and final oocyte maturation in cultured sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus*[J]. Fisheries Science, 2004, 70(3): 360-365.
- [24] Grier H J, Uribe-Aranzábal M C, Patino R. The ovary, folliculogenesis, and oogenesis in teleosts[M]//Reproductive Bi-

- ology and Phylogeny of Fishes (Agnathans and Bony Fishes). Boca Raton: CRC Press, 2009: 39-98.
- [25] Yamamoto K, Yamazaki F. Rhythm of development in the oocyte of the gold-fish, *Carassius auratus*[J]. Bulletin of the Faculty of Fisheries, Hokkaido University, 1961, 12(2): 93-110.
- [26] Cui D, Liu Z W, Liu N X, et al. Histological study on the gonadal development of *Scatophagus argus*[J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(5): 696-704. [崔丹, 刘志伟, 刘南希, 等. 金钱鱼性腺发育及其组织结构观察[J]. 水产学报, 2013, 37(5): 696-704.]
- [27] Wang Y Y. The study of sexul differentiation and gonadal development in the Hong Kong grouper *Epinephelus akaara* and the yellow grouper *E. awoara*[D]. Xiamen: Xiamen University, 2015. [王盈颖. 赤点石斑鱼和青石斑鱼性分化过程中性腺发育的研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2015.]
- [28] Kayano Y. Red spotted groupers[J]. Suisan Zoshoku, 1995, 43: 269-272.
- [29] Kimura M, Karimata H, Nakamoto M, et al. Parent fish cultivation, spawning and the production of feed for seedling production in Malabar grouper, *Epinephelus malabaricus*[J]. Okinawa Prefectural Fisheries Research Center, 2007, 69: 197-199.
- [30] Izumida D, Kobayashi Y, Soyano K. The reproductive sciences[C]//Soyano K, Teruya K, Chuda H. Frontiers of Fisheries Science in Groupers. Tokyo: Kouseisha Kouseikaku, 2015: 9-20.
- [31] Espigares F, Zanuy S, Gómez A. Kiss2 as a regulator of lh and fsh secretion via paracrine/autocrine signaling in the teleost fish european sea bass (*Dicentrarchus labrax*)[J]. Biology of Reproduction, 2015, 93(5): Article 114.
- [32] Tyler C R, Pottinger T G, Coward K, et al. Salmonid follicle-stimulating hormone (GtH I) mediates vitellogenic development of oocytes in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*[J]. Biology of Reproduction, 1997, 57(5): 1238-1244.
- [33] Planas J V, Athos J, Goetz F W, et al. Regulation of ovarian steroidogenesis in vitro by follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone during sexual maturation in salmonid fish[J]. Biology of Reproduction, 2000, 62(5): 1262-1269.
- [34] Kajimura S, Yoshiura Y, Suzuki M, et al. Changes in the levels of mRNA coding for gonadotropin I β and II β subunits during vitellogenesis in the common Japanese conger *Conger myriaster*[J]. Fisheries Science, 2001, 67(6): 1053-1062.
- [35] Suetake H, Okubo K, Sato N, et al. Differential expression of two gonadotropin (GTH) β subunit genes during ovarian maturation induced by repeated injection of salmon GTH in the Japanese eel *Anguilla japonica*[J]. Fisheries Science, 2002, 68(2): 290-298.
- [36] Molés G, Gómez A, Carrillo M, et al. Determination of Fsh quantity and bioactivity during sex differentiation and oogenesis in European sea bass[J]. Biology of Reproduction, 2011, 85(4): 848-857.

Effects of regulation of constant high water temperature on growth and gonadal development, as well as *gnrh*, *fsh β* , and *lh β* gene expression in the juvenile red spotted grouper *Epinephelus akaara*

XU Wengang¹, TANG Yongzheng¹, ZHANG Jianbai², MANABE Soichiro³, SOYANO Kiyoshi³, ZOU Huafeng⁴

1. School of Ocean, Yantai University, Yantai 264005, China;

2. Yantai Institute of Marine Economy, Yantai 264003, China;

3. Institute for East China Sea Research, Nagasaki University, Nagasaki 851-2213, Japan;

4. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education; Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: The growth, development, and reproduction of teleosts are significantly affected by external environmental factors and the functioning of the endocrine system. To understand the effects of regulation with constant water temperature on fish growth and gonadal development, as well as *gnrh*, *fsh β* , and *lh β* reproduction-related gene expression, the juvenile red spotted grouper *Epinephelus akaara*, aged 120 to 420 days post hatching (dph), was used as the target species. Fish in the control group were fed at natural water temperature, whereas those in the experimental groups were fed at a constant water temperature of 26 °C. Fish were sampled every 30 or 40 days. The body length (BL), body weight (BW), gonadal somatic index (GSI), gonadal development frequency, and expression of *gnrh*, *fsh β* , and *lh β* genes were measured, calculated, and compared between the two groups. Results showed that from 240 dph, both the BL and BW in the experimental group were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$). At the end of the trial, the BL and BW in the experimental group were 1.3 and 2 times those of the control group, respectively. The GSI in the control group was maintained below 0.25%. In the experimental group, the GSI was maintained below 0.4% before 330 dph but reached 1% in some individuals at 360 dph. At 360, 390, and 420 dph, the GSI in the experimental group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$). At the end of the trial, vitellogenic oocytes were not detected in the control group but were detected at 330, 360, and 390 dph in the experimental group. There were no significant differences in *gnrh* gene levels in the brain at each stage between the control and experimental group ($P > 0.05$). However, in the pituitary, the *fsh β* gene levels at 360, 390, and 420 dph and *lh β* gene levels at 390 and 420 dph in the experimental group were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$). These results suggest that the regulation of constant water temperature at 26 °C may not only promote an increase in BL, BW, and GSI but also significantly increase the *fsh β* and *lh β* gene levels, thus accelerating gonadal development in the juvenile red spotted grouper.

Key words: *Epinephelus akaara*; juvenile; constant high water temperature; growth; gonadal development; *gnrh*; *fsh β* ; *lh β*

Corresponding author: ZOU Huafeng. E-mail: hfzou@shou.edu.cn