

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2013.00599

温度对金钱鱼卵巢发育的影响

张敏智^{1,2}, 邓思平^{1,2}, 朱春华^{1,2}, 李广丽^{1,2}

1. 广东海洋大学 水产学院, 广东 湛江 524088;

2. 广东海洋大学 南海水产经济动物增养殖广东普通高校重点实验室, 广东 湛江 524088

摘要: 应用比色法、放射免疫测定法(RIA)、连续组织切片及荧光定量 RT-PCR 技术, 检测了不同温度(23℃、26℃、29℃)处理 6 周对 2 龄金钱鱼卵巢发育过程中血清中蛋白磷(SPP)、蛋白钙(SPC)、性类固醇激素(雌二醇 E₂、睾酮 T)及肝和卵巢中卵黄蛋白原 mRNA (vtg mRNA)表达的影响。结果显示, 实验结束(6 周)时, 23℃和 26℃组卵巢中出现 时相卵母细胞, 29℃组仅出现 时相卵母细胞。除肝体指数(HSI)随处理时间延长而减小外, 其他检测指标随时间延长而增加。实验中温度对血清中 T 水平无显著影响; 3 周时, 23℃和 26℃组性腺成熟指数(GSI)及血清中 E₂ 水平略高于 29℃组, 但差异不显著($P>0.05$); 6 周时, 两组 GSI 及血清中 E₂ 水平显著大于 29℃组($P<0.05$); 实验期间 23℃和 26℃组血清中 SPP 含量显著高于 29℃组($P<0.05$), 而血清 SPC 含量仅 23℃组显著高于 29℃组($P<0.05$)。此外, 实验中 vtg 基因在卵巢的表达量明显低于肝的表达量($P<0.05$); 肝中 vtg 表达量与 GSI 及血清中 E₂ 水平变化趋势一致; 实验期间卵巢中仅 26℃组 vtg 表达量显著高于 29℃组($P<0.05$)。本研究结果表明, 金钱鱼卵巢发育的适宜温度范围为 23~26℃, 在此温度范围内 vtg 在肝中的表达量与血清 E₂ 含量存在显著的正相关($P<0.05$)。

关键词: 金钱鱼; 温度; 性类固醇激素; 血清蛋白磷; 血清蛋白钙; vtg 表达

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2013)03-0599-08

温度对鱼类性腺发育、成熟具有显著影响^[1]。由于同种鱼达到性腺成熟的积温基本一致, 在中国南方或温热水域培育的亲鱼, 性腺发育成熟早于北方, 因此可提前产卵^[2]。但是, 过高温度不利于性腺的发育成熟, 如古比鱼(*Poecilia reticulata*)^[1]、海马(*Hippocampus kuda* Bleeker)^[3]和虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[4]。有报道认为, 水温可能直接或间接影响鱼类神经内分泌中枢释放促性腺激素样物质, 该物质可启动性腺发育、分化和成熟; 而且, 在适当温度下, 性类固醇激素(雌二醇 E₂、睾酮 T)含量会随温度增加而逐渐增加^[5]。但有学者发现, 温度对产卵期白鲟(*Acipenser transmontanus* Richardson)^[6]和虹鳟^[7]血清中 E₂、T 水平没有显著影响, 当卵巢停止发育或者卵泡闭锁,

雌激素和雄性激素水平则都会下降^[6]。已知 T 作为 E₂ 的前体, 在芳香化酶的作用下转化为 E₂, 而 E₂ 可促进肝合成卵黄蛋白原(vtg), 从而促进卵巢的发育^[8]。这种逐级影响的关系在金鱼(*Carassius auratus*)^[9]和美洲黄盖蝶(*Limanda ferruginea*)^[10]的研究中也得到了证实。此外, 对鲫(*Carassius auratus*)^[11]和虹鳟^[12]的研究表明, vtg 为钙结合脂磷蛋白(lipophosphoprotein), vtg 含量与血清中蛋白磷(SPP)和蛋白钙(SPC)含量的增加存在一定的正比关系。

金钱鱼(*Scatophagus argus* Linnaeus)又名金鼓鱼, 隶属鲈形目(Perciformes), 刺尾鱼亚目(Acanthuroidei), 金钱鱼科(Scatophagidae), 金钱鱼属。国际上金钱鱼科仅金钱鱼 1 属 3 种, 为广

收稿日期: 2012-10-22; 修订日期: 2013-01-31.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31272640).

作者简介: 张敏智(1987-), 男, 在读硕士研究生, 研究方向为水产经济动物繁殖生理学. E-mail: zhangminzhi-2009@163.com

通信作者: 李广丽, 教授. E-mail: guangli211@yahoo.com.cn

盐性亚热带鱼类,而分布在中国东南沿海的金钱鱼是中国记录在案的金钱鱼科唯一物种^[13],其最适生存温度范围为 20~28℃^[14]。目前,金钱鱼大部分养殖种苗仍然来自野生资源,数量有限且呈逐年减少之势,因此,对人工种苗的需求量逐渐增大。但人工繁育过程中金钱鱼卵巢不能充分成熟,且雄性性成熟早于雌性^[14],为人工繁殖金钱鱼带来困难。迄今,国内外有关金钱鱼繁殖方面的研究仅限于繁殖生物学、催产实验^[15-16]和人工诱导精子成熟^[17-18]等,人工诱导卵母细胞成熟尚未见成功报道。本研究采用不同温度人工诱导金钱鱼卵巢发育,运用放射免疫测定法测定卵巢发育过程血清中 E_2 和 T 水平,用生化方法测定 SPP 和 SPC 的含量,并采用 RT-PCR 技术检测肝和卵巢组织中 *vtg* mRNA 表达,研究性类固醇激素、*vtg* mRNA 表达和卵巢发育变化之间的关系,探讨金钱鱼卵巢发育的最适温度及卵巢发育过程的生殖内分泌调控机理,为解决金钱鱼大批量苗种人工繁育问题提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

二龄雌性金钱鱼购自于广东省珠海市龙胜鱼苗培育基地,体质量(316.3 ± 70.3) g,体长(21.4 ± 2.0) cm。实验前于 5 m×4 m×1.3 m 的水泥池中暂养 1 周,昼夜充氧,温度为(20 ± 1)℃,自然光照,每日傍晚投喂 1 次海水鱼配合饲料,实验在该基地进行。

1.2 方法

1.2.1 实验设计及样品处理 实验分为 3 组,每组 20 尾鱼,分别饲养在水温为 23℃、26℃和 29℃的塑料桶(500 L)中,自然光照,24 h 不间断充氧,水体盐度为 10 ± 2 ,日换水量为 2/3。分别于实验前(0 周)、3 周和 6 周时,每组随机取 6 尾鱼,分别测量体质量和体长,尾静脉取血 1~2 mL,经 4℃放置 4~6 h 后,6 000 r/min 离心 5 min,取血清,贮存于-20℃用于性类固醇激素、SPC 和 SPP 含量的测定;解剖后称性腺质量(GW)和肝质量(LW),分别计算性腺成熟系数($GSI = GW/BW \times$

100%)、肝体指数($HSI = LW/BW \times 100\%$),并随机取其中的 3 尾鱼部分肝和卵巢组织,迅速投入液氮保存,运回实验室后贮存于-80℃用于 *vtg* mRNA 表达分析;仅实验前和实验 6 周时,分别取 6 尾鱼卵巢中部小块, Bouin 氏液固定后用于组织学观察。

1.2.2 组织学观察 固定卵巢组织经梯度酒精脱水,二甲苯透明,54~56℃石蜡包埋,连续切片,厚度为 6~8 μm, HE 染色,显微镜下观察卵巢的发育。

1.2.3 血清中性类固醇激素、SPC 和 SPP 的测定

采用天津九鼎医学生物工程有限公司生产的 E_2 和 T 放射免疫试剂盒,在 SN-684 型放射免疫计数器(北京泰亚赛福科技有限公司)上测定沉淀计数(cpm/min),从而测定血清中 E_2 和 T 含量。 E_2 和 T 的灵敏度分别为 2.1 pg/mL 和 1.9 ng/dL,批内变异系数分别为 7.7%和 7.4%,测定在广东医学院放免实验室完成。

SPC 含量由钙测定,原理为:血清中钙离子在碱性溶液中与甲基百里香酚兰(MTB)结合,生成蓝色络合物。通过比色与同样处理的钙标准进行比较,可计算出钙的含量。实验操作严格按钙测定试剂盒(购自南京建成生物工程研究所)说明书进行。

SPP 根据 Van Der Lingen 等^[19]的钼酸铵法测定,稍加改进。取血清 0.2 mL 加 20%的 TCA 2.0 mL,30℃静止 10 min,3 000 r/min 离心 10 min,去除上清液,将沉淀于 60℃水浴中依次加入乙醇、乙醇-乙醚-氯仿($V/V/V=2/2/1$)的混合液、丙酮、乙醚各 2.0 mL 进行提纯和脱水,沉淀于室温下干燥 2 h。取空白管和 5 个标准管内各含 0、5、10、25、50、100 μg 标准磷,加入 1.0 mL 2 mol/L 的 NaOH,沸水浴 20 min。冷却,加 1.0 mL 2 mol/L 的盐酸,加 2 mol/L 2 mL 的 NaOH、2 mL 异丁醇-甲苯的混合液($V/V=1/1$)、0.4 mL 0.2 mol/L 的硅钨酸和 1 mL 40 mmol/L 的钼酸铵,摇匀,3 000 r/min 离心 10 min,取有机相 1.0 mL,加 0.16 mL 稀氯化亚锡(现配现用,0.5 g 氯化亚锡溶于 1.25 mL 浓盐酸中,用 1 mol/L 的硫酸定容到

100 mL), 再加 3.8 mL 2%的硫代乙醇酸, 摇匀, 静止, 吸出上层油状物, 650 nm 波长处测吸光度, 与磷标准曲线比较求出样品的含磷量。结果以每毫升血清中含有的蛋白磷微克数表示。

1.2.4 金钱鱼 *vtg* 基因片段克隆及其表达 根据 GenBank 中鱼类卵黄蛋白原基因 *vtg* 保守序列设计简并引物 P1 和 P2 以及 P3 和 P4, 根据获得的 *vtg* 基因保守区片段(经 BLAST 确认)设计特异性引物 P5 和 P6, 检测温度处理后金钱鱼肝和卵巢 *vtg* 基因的表达情况。根据本实验室已克隆金钱鱼 β -actin 基因片段(登录号为 KC161966)设计内参引物 β -actinF 和 β -actinR。所有引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成(表 1)。

表 1 克隆金钱鱼 *vtg* cDNA 序列片段及检测表达所用引物
Tab.1 Primers used for cloning and expression analysis of *vtg* in *Scatophagus argus*

引物 primer	序列(5'-3') sequence(5'-3')	碱基位置/nt position
P1	ATGARAGCDGTTGTDCTHGC	1-20
P2	CAGCCAKGAAYTCTCTCYTTGA	1160-1180
P3	CCTAYGTRTAYAASTATGARGC	86-107
P4	GGTCTYYTTGAKGTTTSAAGCTG	421-441
P5	TTAATTCCAGCAACCAAGCCGTC	180-202
P6	ACCTCTGTAAATGTCCAGCACCA	298-320
β -actinF	GAGAGGTTCCGTTGCCAGAG	131-151
β -actinR	CAGACAGCACAGTGTGGCGT	255-275

注 Note: R=A+G, D=A+G+T, H=A+C+T, K=G+T, Y=C+T, S=G+C.

取雌性金钱鱼肝, 抽提总 RNA, 实验流程参照 Trizol Reagent(Invitrogen)说明书操作。取 2 μ g 总 RNA 按照 Promega 公司反转录试剂盒合成 cDNA 第 1 链, 通过巢式 PCR(先后利用引物 P1 和 P2 以及 P3 和 P4)获得 *vtg* 的保守片段, 其 PCR 反应程序统一为: 预变性 94℃ 4 min, 变性 94℃ 30 s, 退火 52℃ 30 s, 延伸 72℃ 1 min, 35 个循环后 72℃ 延伸 10 min。参照 BioRad SYBR 荧光实时定量 PCR 测定试剂盒操作, 肝取反转录产物 0.5 μ L, 卵巢取反转录产物 0.8 μ L, 荧光实时定量 PCR 检测 *vtg* 在肝和卵巢中的表达。荧光定量 PCR 反应体系为 10 μ L, 反应程序为: 预变性 95℃ 30 s, 1 个循环; 变性 95℃ 5 s, 退火/延伸 54.9℃ 5 s, 40

循环; 溶解曲线温度为 65~95℃ 5 s, 1 循环。

1.3 数据处理

根据荧光实时定量 PCR 测得的 C_t 值, 运用 $2^{-\Delta C_t}$ 法计算 *vtg* 和 β -actin 在金钱鱼肝和卵巢组织的表达量, 以金钱鱼 β -actin 基因为内参, 校正 *vtg* 的相对表达量。实验数据采用 SPSS 17.0 统计软件中的单因素方差分析(ANOVA), 显著水平为 0.05; 并采用 Duncan's 方法进行多重比较分析; 所有结果均以平均值 $\pm$ 标准误($\bar{x} \pm SE$)表示。

2 结果与分析

2.1 温度对雌性金钱鱼 GSI、HSI 和卵巢发育的影响

如表 2 所示, 随处理时间的延长, 23℃ 和 26℃ 组 GSI 逐渐增加, 且相互之间无显著性差异 ($P>0.05$), 而 29℃ 组 GSI 变化不明显, 6 周时 23℃ 和 26℃ 组 GSI 显著高于 29℃ 组 ($P<0.05$)。3 个温度组的 HSI 均随处理时间的延长逐渐减小, 但不同温度组相互之间无显著性差异 ($P<0.05$)。

实验前, 金钱鱼卵巢表现为 II 期早期(图 1a), 其内大部分为 II 时相卵母细胞, 胞径 44~120 μ m, 细胞质嗜酸性, 核径 15~38 μ m; 实验结束时(6 周), 23℃ 组卵巢为兼性 II、III 期, 向 III 期过渡(图 1b), 此期卵巢除了 II 时相卵母细胞外, 还出现了 III 时相卵母细胞, 即卵黄生成前细胞(PVO), 同时出现了大小不一的油滴, 其细胞胞径为 62~162 μ m, 核径为 23~77 μ m, 细胞质呈强碱性; 26℃ 组卵巢发育情况和 23℃ 组基本一致(图 1c), 其细胞胞径为 64~147 μ m, 核径为 25~75 μ m, 细胞质呈弱嗜碱性; 29℃ 组卵巢为 II 期晚期(图 1d), 其内几乎全为 II 时相卵母细胞, 胞径为 31~138 μ m, 而细胞核较 II 期变小, 核径为 15~33 μ m, 细胞质强嗜碱性。

2.2 温度对雌性金钱鱼血清中性类固醇激素的影响

随处理时间延长, 23℃ 和 26℃ 组血清中 E_2 水平显著增加 ($P<0.05$), 而 29℃ 组无显著变化 ($P>0.05$, 图 2)。23℃ 和 26℃ 组血清中 E_2 水平差异不明显 ($P>0.05$), 但 6 周都显著高于 29℃ 组 ($P<0.05$)。不同温度处理对血清中 T 水平无显著影响

表 2 温度处理后金钱鱼卵巢发育过程中 GSI 和 HSI 的变化
Tab. 2 GSI and HSI in female *Scatophagus argus* treated by different temperature

n=6; $\bar{x} \pm SE$; %

分组 group	不同处理时间(周)的 GSI gonadosmatic index			不同处理时间(周)的 HSI hepatosomatic index		
	0	3	6	0	3	6
23℃	0.72±0.11 ^a	1.04±0.07 ^{bc}	1.16±0.05 ^c	3.30±0.24 ^d	3.12±0.26 ^{cd}	2.58±0.35 ^{ab}
26℃	0.72±0.11 ^a	1.08±0.07 ^{bc}	1.18±0.1 ^c	3.30±0.24 ^d	2.70±0.17 ^{bc}	2.40±0.12 ^{ab}
29℃	0.72±0.11 ^a	0.86±0.04 ^{ab}	0.96±0.03 ^{ab}	3.30±0.24 ^d	2.89±0.14 ^{bc}	1.98±0.16 ^a

注:不同上标字母表示差异显著($P < 0.05$, Duncan 氏检验).
Note: Values with different superscripts indicate significant difference($P < 0.05$, Duncan's multiple range test).

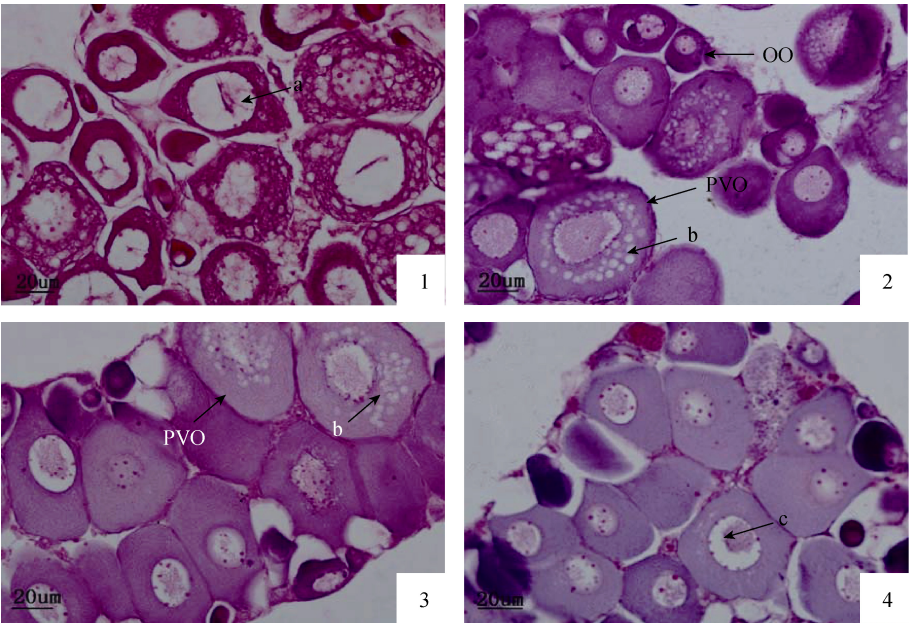


图 1 温度对金钱鱼卵巢发育的影响

1. 实验前(0 周), 箭头 a 示染色质; 2. 23℃组实验 6 周, 示初级卵母细胞(OO)和卵黄生成前卵母细胞(PVO), 箭头 b 示油滴, 3. 26℃组实验 6 周, 示卵黄生成前卵母细胞(PVO), 箭头 b 示油滴, 4. 29℃组实验 6 周, 箭头 c 示核仁.

Fig. 1 Effects of temperature on ovarian development of *Scatophagus argus*

1. Gonad structure before the experiment, showing chromatin (arrow a). 2. Gonad structure at 6 weeks after the experiment, showing primary oocyte (OO), previtellogenic oocyte(PVO) and oil droplet (arrow b) in 23℃ group. 3. Gonad structure at 6 weeks after the experiment, showing previtellogenic oocyte(PVO) and oil droplet (arrow b) in 26℃ group. 4. Gonad structure at 6 weeks after the experiment, showing nucleoli (arrow c) in 29℃ group.

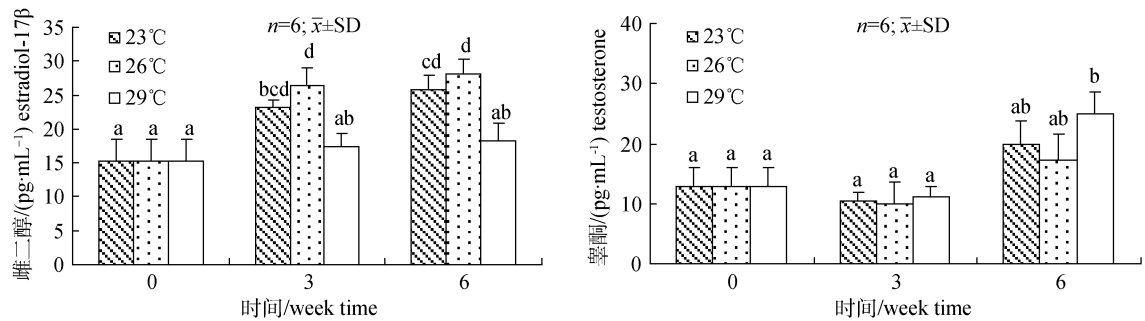


图 2 温度对雌性金钱鱼血清中性类固醇激素的影响

Fig. 2 Effects of temperature on the sex steroid hormone levels in female *Scatophagus argus*

($P>0.05$), 仅 6 周时 29℃ 组血清中 T 水平高于其他取样点($P<0.05$, 图 2)。

2.3 温度对雌性金钱鱼血清中 SPP 和 SPC 的影响

随处理时间的延长, 血清中 SPP 和 SPC 含量比实验前显著增加。3 周时 23℃ 和 26℃ 组血清中 SPP 明显大于 29℃ 组($P<0.05$), 但 6 周时各温度组间无显著差异($P>0.05$, 图 3)。实验过程中, 23℃ 组血清中 SPC 显著高于 29℃ 组($P<0.05$), 但 26℃ 和 29℃ 组间 SPC 无显著差异($P>0.05$, 图 3)。

2.4 金钱鱼 *vtg* 保守区片段的克隆及其表达

先后以简并引物 P1 和 P2 以及 P3 和 P4 进行 RT-PCR 扩增, 在 250~500 bp 之间有 1 条清晰条带, 片段大小约 356 bp, 经 BLAST 确定为金钱鱼 *vtg* 保守片段(登录号 JQ366072)。

实时荧光定量结果显示(图 4A), 23℃ 和 26℃ 组 *vtg* 在肝中的表达量随处理时间延长而增加, 而 29℃ 组 *vtg* 表达量不变, 23℃ 和 26℃ 组各时间点 *vtg* 表达量无显著差异($P>0.05$), 但 6 周时显著高于 29℃ 组($P<0.05$)。 *vtg* 在卵巢的表达量明显低于肝的表达量, 23℃ 和 29℃ 组 *vtg* 在卵巢的表达量与实验前相比无显著变化($P>0.05$), 但 26℃ 组 *vtg*

表达量随处理时间而逐渐增加, 3 周和 6 周均显著高于 23℃ 和 29℃ 组($P<0.05$, 图 4B)。

3 讨论

鱼类的繁殖受各种环境因子(如温度、光照、营养、密度、pH 等)的影响^[1-7, 20], 其中温度和光照起主导性作用。鱼类和其他冷血动物一样, 温度对其性腺发育起重要作用^[1], 但是温度对鱼类性腺发育的影响因鱼种而异^[21]。现有报道^[3-4, 6-7]指出, 鱼类的性腺发育应该存在一个适宜温度范围, 温度过高将不利于鱼性腺的发育。Fjellidal 等^[20]认为, 高温降低大西洋鲑(*Salmo salar*)性腺成熟度; Dzikowski 等^[1]也发现温度达到 32℃ 时, 雌性孔雀鱼(*Poecilia reticulata*)的卵巢将会退化。本研究发现, 在实验结束时, 23℃ 和 26℃ 组金钱鱼性腺成熟指数(GSI)明显高于 29℃ 组, 表明温度过高(超过 29℃)将不利于金钱鱼卵巢的发育, 与上述研究结果一致。本研究组织学表明, 实验前金钱鱼卵巢处于 II 期早期阶段; 经不同温度处理 6 周后, 23℃ 和 26℃ 组金钱鱼卵巢为兼性 II、III 期, 向 III 期过渡; 而 29℃ 组卵巢此时为 II 期晚期, 所

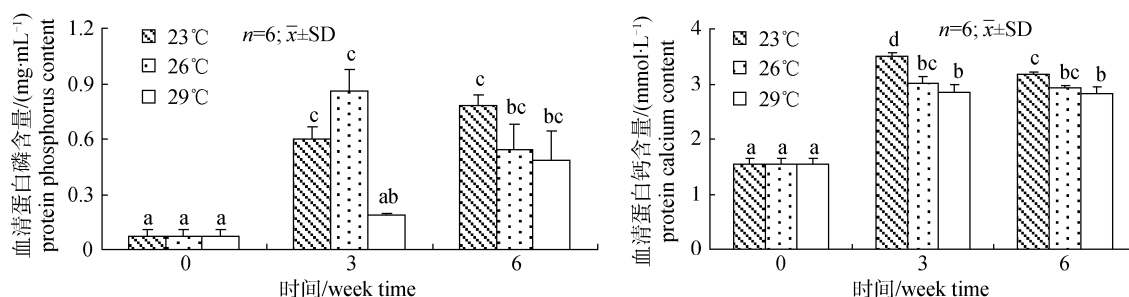


图3 温度对雌性金钱鱼血清中 SPP 和 SPC 的影响

Fig. 3 Effects of temperature on the serum protein phosphorus and protein calcium levels in female *Scatophagus argus*

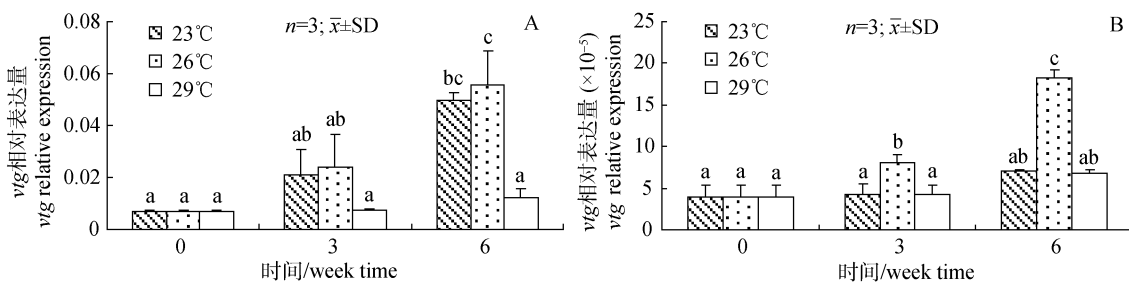


图4 温度对雌性金钱鱼 *vtg* 在肝(A)和卵巢(B)表达的影响

Fig. 4 Effects of temperature on *vtg* expression in liver (A) and ovary (B) of female *Scatophagus argus*

有卵巢发育时期对应的卵巢成熟指数和卵母细胞直径均与蔡泽平等^[15]研究结果基本一致。同时,也说明 23℃和 26℃组对卵巢发育的促进作用明显大于 29℃组。推测由于金钱鱼的最适生长温度范围较窄,为 20~28℃^[14],因而适于其性腺发育成熟的温度范围可能更窄,29℃可能已超出其最适生存范围,因此不利于性腺的发育。

研究表明,硬骨鱼类性类固醇激素表达变化与性腺发育的季节变化或 GSI 密切相关,温度可能通过启动脑-垂体-性腺轴(BPG)生理功能,从而调控卵巢的发育过程^[9,22]。有报道表明,温度对雌性白鲟^[6]、虹鳟^[7]产卵前血清中 E₂ 和 T 无显著影响,但本研究发现 23℃和 26℃组 E₂ 随处理时间延长显著增加,实验结束时显著大于 29℃组,与白鲟和虹鳟的研究结果不完全一致,推测可能是因为本研究中金钱鱼卵黄尚未开始形成,而白鲟和虹鳟的研究在实验开始时已接近产卵期。有报道指出血清中 E₂ 将在卵黄生成阶段达到峰值^[9,22-24],因此,本研究中金钱鱼 23℃和 26℃组 E₂ 逐渐增大。此外,本研究中温度对血清中 T 水平无显著影响,但 T 变化趋势与 E₂ 一致。Laura 等^[9]研究发现,金鱼 E₂ 浓度与卵细胞发育密切相关,在卵黄生成晚期达最大值,而在成熟时的核迁移期含量明显下降。本研究组织学结果显示,23℃和 26℃组都出现了卵黄生成前细胞,而 29℃组尚未出现卵黄生成前细胞,说明卵巢发育程度与 E₂ 浓度有明显的正相关,与前人研究结果一致。

卵黄蛋白原(vtg)是由性成熟雌鱼肝合成的一种特异性蛋白,为正在发育的胚胎提供氨基酸、脂肪、碳水化合物、维生素、磷和硫等营养及功能性物质。当鱼类卵巢中卵黄开始生成时,雌鱼肝合成的 vtg 通过血液输送到卵巢,到卵子成熟时血清中 vtg 达到峰值。本研究显示,实验结束时,23℃和 26℃组 vtg mRNA 在肝中的表达量显著高于 29℃组,表明温度范围为 23~26℃时 vtg 在肝中的表达量和 E₂ 存在显著的正相关。而 vtg 在卵巢表达量比肝的表达量低很多,这主要是因为肝是合成卵黄蛋白前体物 vtg 的场所,通过血液输送 vtg 至卵巢后,在卵巢中代谢形成卵黄蛋白。

血清中蛋白结合磷主要来自于 vtg,且 vtg 中的磷含量是相对稳定的,因此,常用血清蛋白磷(SPP)含量间接表示 vtg 的含量^[25]。对 SPP 的研究表明,除 26℃组 SPP 在 6 周稍降低外,SPP 的变化与 vtg 在肝的表达趋势基本一致,SPP 含量的变化与卵巢的发育成熟程度密切相关,与双帆鱼(*Coracinus capensis* Cuvier)^[19]和斑鳅(*Siniperca scherzeri*)^[26]的研究结论一致。而且 vtg 为钙结合脂磷蛋白(lipophosphoprotein),故血清中的钙含量也会随 vtg 的出现而增加^[11,27]。在黑头呆鱼(*Pimephales promelas*)^[25]和小体鲟(*Acipenser ruthenus*)^[28]的研究中发现,血清蛋白钙(SPC)和 vtg 含量有着显著性的线性关系,测定血清中钙的含量能够较准确地间接反映 vtg 的含量。本研究发现,3 周时各温度组 vtg mRNA 在肝的表达无显著增加,而各组 SPC 含量却显著增加;6 周时 23℃和 26℃组 vtg 在肝的表达明显高于 29℃组,而 SPC 仅有 23℃组显著高于 29℃组,表明肝中 vtg mRNA 的表达与 SPC 并无显著的正相关。推测可能是在卵巢发育早期(II—III),受其他钙结合蛋白和个体内游离钙的影响,导致血清中 SPC 含量与肝中 vtg mRNA 表达量的关系不明显。

综上所述,本研究认为金钱鱼卵巢发育的适宜温度范围为 23~26℃,在此温度范围内 vtg 在肝中的表达与 E₂ 存在显著的正相关。

参考文献:

- [1] Dzikowski R, Hulata G, Karplus I, et al. Effect of temperature and dietary L-carnitine supplementation on reproductive performance of female guppy (*Poecilia reticulata*)[J]. Aquaculture, 2001, 199: 323-332.
- [2] 关忠志, 刘吉明, 李东占. 光照和水温对香鱼性腺发育的影响[J]. 水产学杂志, 2009, 22(4): 27-30.
- [3] Lin Q, Lu J Y, Gao Y L, et al. The effect of temperature on gonad, embryonic development and survival rate of juvenile seahorses, *Hippocampus kuda* Bleeker[J]. Aquaculture, 2006, 254: 701-713.
- [4] Pankhurst N W, Thomas P M. Maintenance at elevated temperature delays the steroidogenic and ovulatory responsiveness of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* to luteinizing hormone releasing hormone analogue [J]. Aquaculture, 1998,

- 166:163–177.
- [5] 林加涵, 方永强, 刘建, 等. 不同水温对文昌鱼性腺发育的影响[J]. 台湾海峡, 1996, 15(2): 170–173.
- [6] Molly A H W, Joel P V E, Serge I D, et al. Preliminary observations on the effects of holding temperature on reproductive performance of female white sturgeon, *Acipenser transmontanus* Richardson [J]. Aquaculture, 1999, 176: 315–329.
- [7] Pankhurst N W, Purser G J, Kraak G V D, et al. Effect of holding temperature on ovulation, egg fertility, plasma levels of reproductive hormones and in vitro ovarian steroidogenesis in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. Aquaculture, 1996, 146: 277–290.
- [8] Tyler C R, Aerle V R. An *in vivo* testing system for endocrine disruptors in fish early life stages using induction of vitellogenin [J]. Environ Toxicol Chem, 1999, 18: 337–347.
- [9] Laura S, Charles R T, Ronny V A, et al. Effects of atrazine on sex steroid dynamics, plasma vitellogenin concentration and gonad development in adult goldfish (*Carassius auratus*) [J]. Aquat Toxicol, 2004, 66: 369–379.
- [10] Anthony J M, Margaret P M B, Laurence W C. The timing of puberty in cultured female yellowtail flounder, *Limanda ferruginea* (Storer): Oogenesis and sex steroid production *in vivo* and *in vitro* [J]. Aquaculture, 2008, 279: 188–196.
- [11] 赵兵, 刘征涛, 徐章法, 等. E_2 诱导的鲫鱼 (*Carassius auratus*) 幼鱼血清中卵黄蛋白原和钙含量相关性研究[J]. 环境科学研究, 2006, 19(2): 23–30.
- [12] Verslycke T, Vandenbergh G F, Versonnen B, et al. Induction of vitellogenesis in 17 α -ethinylestradiol-exposed rainbow-trout (*Oncorhynchus mykiss*): a method comparison [J]. Comp Biochem Physiol, 2002, 132C: 483–492.
- [13] Barry T P, Castanos M T, Fast A W, et al. Gonadal maturation and spawning induction in female spotted scat (*Scatophagus argus*) [J]. J Aquacult Trop, 1993, 8: 121–130.
- [14] 兰国宝, 阎冰, 廖思明, 等. 金钱鱼生物学研究及回顾[J]. 水产科学, 2005, 24(7): 39–41.
- [15] 蔡泽平, 王毅, 胡佳玮, 等. 金钱鱼繁殖生物学及诱导产卵试验[J]. 热带海洋学报, 2010, 29(5): 180–185.
- [16] Fast A W. Spawning induction and pond culture of the spotted scat (*Scatophagus argus* Linnaeus) in the Philippines [C]// Hawaii Institute of Marine Biology Technical Report No. 39. Kaneohe, Hawaii: Mariculture Research & Training Center, 1988: 145.
- [17] Biona S H, Tabanda R, Fast A W, et al. The effects of two pond stocking densities and methyl-testosterone feeding on growth of spotted scat (*Scatophagus argus*) in monoculture [C]. Hawaii Institute of Marine Biology Technical Report No. 39. Kaneohe, Hawaii: Mariculture Research & Training Center, 1988: 74–85.
- [18] Barry T P, Castanos M T, Fast A W, et al. Induced spermiation in the male spotted scat (*Scatophagus argus*) by long-term administration of 17 α -methyltestosterone followed by LHRHa [J]. Asian Fish Sci, 1991, 4(2): 137–145.
- [19] Van Der Lingen C D, Cook P A. Sex determination of live Galjoen (*Coracinus Capensis* Cuvier) using a biochemical technique [J]. Aquaculture, 1990, 86: 283–289.
- [20] Fjellidal P G, Hansen T, Huang T S. Continuous light and elevated temperature can trigger maturation both during and immediately after smoltification in male Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. Aquaculture, 2011, 321: 93–100.
- [21] Munro A D, Scott A P, Lam T J. Reproductive seasonality in teleosts: Environmental influences [M]. Boca Raton: The Chemical Rubber Company Press, 1990: 145–239.
- [22] Poortenaar C W, Hooker S H, Sharp N. Assessment of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) reproductive physiology, as a basis for aquaculture development [J]. Aquaculture, 2001, 201: 271–286.
- [23] Kanamaru T, Nakamura M, Murata R, et al. Induction of sexual maturation of the female honeycomb grouper *Epinephelus merra* in the nonbreeding season by modulating environmental factors with GnRH analogue implantation [J]. Aquaculture, 2012, 358–359: 85–91.
- [24] Li G L, Liu X C, Lin H R. Seasonal changes of serum sex steroids concentration and aromatase activity of gonad and brain in redspotted grouper (*Epinephelus akaara*) [J]. Anim Reprod Sci, 2007, 99: 156–166.
- [25] David K G, Peyster A D. Plasma calcium as a surrogate measure for vitellogenin in fathead minnows (*Pimephales promelas*) [J]. Ecotoxicol Environ Safety, 2004, 58: 90–95.
- [26] 杨武, 赵金良, 邓燕飞, 等. 斑鳃卵巢发育与血清蛋白磷含量变化关系的初步分析[J]. 上海海洋大学学报, 2010, 19(2): 162–166.
- [27] Linares-Casenave J, Kroll K J, Eenennaam J P V, et al. Effect of ovarian stage on plasma vitellogenin and calcium in cultured white sturgeon [J]. Aquaculture, 2003, 221: 645–656.
- [28] 齐茜, 曲秋芝, 张颖, 等. 小体鲟血清卵黄蛋白原和 Ca^{2+} 浓度与卵巢发育的关系[J]. 中国水产科学, 2009, 16(6): 967–974.

Effects of temperature on ovarian development in *Scatophagus argus*

ZHANG Minzhi^{1,2}, DENG Siping^{1,2}, ZHU Chunhua^{1,2}, LI Guangli^{1,2}

1. Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;

2. Key Laboratory of Aquaculture in South China Sea for Aquatic Economic Animal of Guangdong Higher Education Institutes, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China

Abstract: We evaluated the effects of temperature on ovarian development in 2-year-old female *Scatophagus argus*. Fish were reared at 23, 26, and 29°C for 6 weeks. We measured the levels of serum sex steroid hormones (estradiol-17 β , E₂; testosterone, T), protein phosphorus (SPP), and protein calcium (SPC). In addition, we quantified vitellogenin (*vtg*) mRNA expression in the liver and ovary. We observed phase III oocytes in the ovaries of fish reared at 23°C and 26°C. In contrast, the oocytes in the group reared at 29°C did not develop beyond phase II by the end of the experiment (6 weeks). The majority of the indices increased with treatment time, except the hepatosomatic index (HSI). Temperature had no effect on the levels of testosterone. The gonadosomatic index (GSI) and E₂ levels were significantly elevated in fish held at 23°C and 26°C compared with those held at 29°C after 6 weeks ($P < 0.05$). The levels of SPP were higher in fish held at 23°C and 26°C than in those held at 29°C group, but the difference was only significant for the group held at 23°C ($P < 0.05$). The level of *vtg* mRNA expression was lower in the ovary than in the liver. The effect of temperature on liver *vtg* expression was similar to that on GSI and E₂ levels. However, ovarian *vtg* mRNA expression was only significantly higher in the 26°C group compared with the 29°C group. In summary, the optimal temperature for the ovarian development of *S. argus* is between 23 and 26°C. In addition, there is a significant positive correlation between liver *vtg* mRNA expressions and serum E₂ content.

Key words: *Scatophagus argus*; temperature; sex steroid hormone; serum protein phosphorus; serum protein calcium; *vtg* mRNA expression

Corresponding author: LI Guangli. E-mail: guangli211@yahoo.com.cn