

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.00836

养殖圆斑星鲈血浆性类固醇激素表达与卵巢发育及温光调控的关系

徐永江^{1,2}, 柳学周^{1,2}, 王清印^{1,2}, 赵明^{1,2}, 王妍妍^{1,2}, 曲建忠³

1. 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;
2. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室, 山东 青岛 266071;
3. 青岛忠海水产有限公司, 山东 青岛 266414

摘要: 系统研究了人工养殖条件下圆斑星鲈(*Verasper variegatus*)亲鱼血浆性类固醇激素的年周期变化规律及其与卵巢发育成熟及温光调控的关系。结果表明, 圆斑星鲈卵巢发育属非同步分批发育模式, 一年一次成熟分批产卵类型。卵巢年周期发育过程中可见 5 个发育时相的卵母细胞, 卵巢发育可化分为 4 个成熟阶段, 6 个发育时期。性腺指数(GSI)、肝脏指数(HSI)和肥满度(CF)在亲鱼的年周期发育中呈现规律性的变化。亲鱼血浆中雌二醇(E₂)在产卵期达峰值; 排卵结束后, E₂表达水平降至较低水平。血浆中睾酮(T)含量在 10 月达峰值, 并在产卵期间保持相对较高表达水平。统计分析表明, 血浆 E₂水平与 GSI 和 HSI 值的变化都呈现显著的正相关关系($P<0.05$)。水温 and 光周期对卵巢发育具有明显的影响并显著影响 E₂的表达, GSI 与水温存在显著的负相关关系($P<0.05$), HSI 与水温存在显著的负相关关系($P<0.05$), 而 CF 与光周期呈现显著的负相关关系($P<0.05$)。结论认为, 圆斑星鲈雌性亲鱼血浆性类固醇激素表达水平变化与性腺发育(卵母细胞成熟)、水温等具有显著的相关关系。本研究结果可作为温光调控人工亲鱼性腺发育成熟、激素诱导亲鱼产卵的重要参考技术依据。

关键词: 圆斑星鲈; 卵巢发育; 性类固醇激素; 温光调控

中图分类号: S96

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)04-0836-11

在过去的几十年中, 随着世界范围内鲆鲽鱼类养殖热潮的兴起, 研究者们热衷于开发新的养殖品种用于人工养殖和资源增殖。鱼类人工繁殖的成功依赖于生殖周期的人为调控, 而人为生殖调控成功的前提是充分认识鱼类性腺发育的规律及其与温度、光周期等环境因子以及激素诱导间的关系, 目前在很多鱼种上已经取得了可以用于实践的成果^[1-2]。卵生硬骨鱼类的卵巢发育模式和内分泌研究较多, 但是卵巢发育的特点和时间及其与内分泌调控的关系因鱼种生殖模式和对环境刺激响应程度的不同而各显不同。鱼类的配子发生和性腺成熟是神经内分泌系统通过脑-垂体-性

腺(BPG)轴的调控实现的, 性腺在脑垂体释放的促性腺激素(GtHs)刺激下合成性类固醇激素, 促进卵母细胞发育成熟^[3]。因此, 性类固醇激素表达水平的测定可为评价鱼类 BPG 轴生理功能和生殖状态提供重要信息^[4]。性腺指数(GSI)、肥满度(CF)和肝脏指数(HSI)作为评价鱼类性腺发育的重要指标, 为评估鱼类的性腺发育潜能提供了数量依据, 并与性类固醇激素表达存在直接或者间接的联系。

圆斑星鲈(*Verasper variegatus*)属鲽形目(Pleuronectiformes), 鲽科(Pleuronectidae), 星鲽属(*Verasper*), 主要分布于中国黄海、渤海、东海

收稿日期: 2010-07-25; 修订日期: 2010-09-16.

基金项目: 国家 863 计划项目(2006AA10A414; 2010AA10A402); 公益性农业行业专项项目(nyhyzx07-046); 国家鲆鲽类产业技术体系建设项目(nycytx-50); 农业科技成果转化资金项目(2008GB23260382).

作者简介: 徐永江(1981-), 男, 助理研究员, 主要从事鱼类繁殖生理和内分泌研究. E-mail: xuyj@ysfri.ac.cn

通信作者: 柳学周, 研究员. E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

以及日本、朝鲜等海域。其肉质鲜嫩, 营养价值和商业价值高, 是一种极具人工养殖和资源增殖开发利用前景的优良鱼种。目前, 在人工温光调控下, 圆斑星鲈性腺虽然可以发育, 但很多情况下卵母细胞常常不能达到最终成熟并排卵, 这种现象的根本原因可能是人工养殖条件下的亲鱼不能经历与其原产卵地相同的成熟诱导条件或者是因为养殖胁迫, 养殖亲体垂体释放促成熟的促性腺激素—促黄体素(LH)失败, 致使血浆中性类固醇激素的产生不足而导致性腺中卵母细胞最终不能达到完全成熟排放^[2]。因此, 在星鲈人工繁殖过程中, 了解其性腺发育的规律和生殖的内分泌特征显得尤为重要。为了充分认识人工养殖条件下圆斑星鲈亲鱼的繁殖特性, 本研究利用组织学手段、数量性状测量技术、放射免疫分析技术等手段, 首次系统研究了亲鱼卵巢的年周期发育过程中血浆中性类固醇激素的表达规律与性腺成熟及温度、光周期调控的关系, 以期为圆斑星鲈人工亲鱼生殖调控产卵技术提供参考依据。目前, 关于人工养殖条件下圆斑星鲈的卵巢发育特征及其内分泌规律国内外尚未见报道。

1 材料与方法

1.1 实验鱼培育及温光调控

实验于2008年5月–2009年4月在青岛忠海水产有限公司进行。实验鱼为人工培育的达到性

成熟的F₁3龄以上体色正常、健康的圆斑星鲈雌性亲鱼, 全长39~62 cm, 体质量1 200~2 800 g。实验使用容积为25 m³的圆形水泥池2个作为亲鱼培育池, 培育亲鱼数量145尾, 亲鱼培育密度2~3尾/m³。亲鱼饵料为活沙蚕、贝肉。日投喂2次, 投喂量为鱼体质量的2%~3%, 及时清除残饵、排污。对亲鱼进行温度和光照调控, 培育池以黑色不透光幕布围遮, 水温由自然海水和地下井水混合调控。光照由白炽灯(60 W)提供, 调节水面光照强度为280 lx。产卵期结束后, 亲鱼重新置于自然光照和水温下。亲鱼周年培育水温和光周期变化见图1。

1.2 取样方法及样品处理

实验鱼的性腺取样为每月取样一次, 每次取样3~4尾。实验鱼先用MS222(300 mg/L)麻醉致死解剖, 小心取出卵巢, 分别取卵巢的前中后部, 样品在Davis固定液中固定24 h后转入70%酒精保存。血液取样与卵巢取样同步进行, 每次取样选择性腺发育基本一致的雌性亲鱼5~8尾。取血使用1 mL无菌注射器, 采用背面尾静脉抽血方法, 每尾鱼抽血1.5 mL, 保存在1.5 mL Ependorf离心管中, 15 000 r/min离心10 min后, 分离上层血清, 保存在-40℃备用。

1.3 组织切片和性腺分期

性腺样品经酒精梯度(70%~100%)脱水, 石蜡包埋, 切成7~9 μm厚的切片, 苏木精伊红染

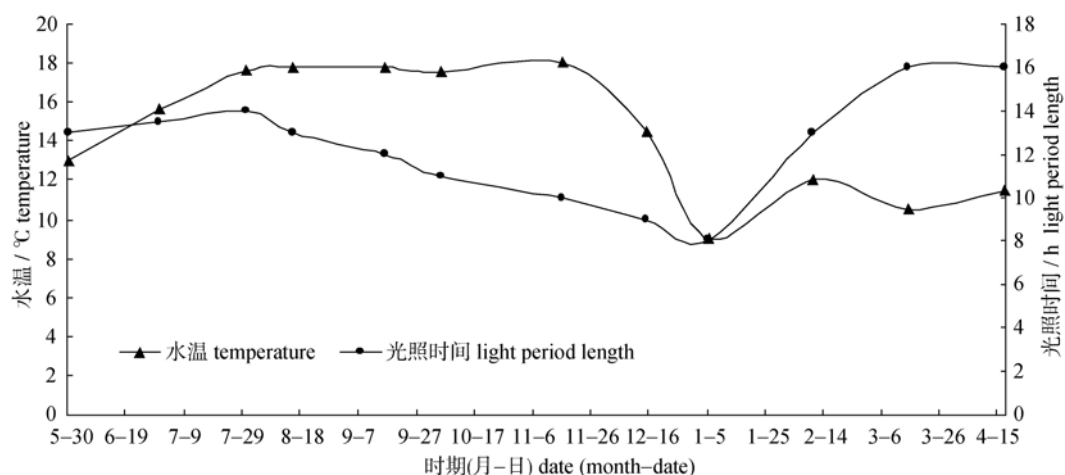


图1 亲鱼周年培育水温和光照时间变化

Fig.1 Year round photothermal conditioning schedule used to mature captive broodstocks

色后,中性树胶封片,在显微镜下观察(NIKON 90i),拍照。性腺发育期的划分按照参照 Merson 等^[4]的标准,以不同的性腺发育期卵巢中占优势的卵母细胞时相作为划分依据,并用目微尺测量卵母细胞直径,作为该发育期中主要发育时相的卵母细胞的平均直径(表 1),统计视野为 20 个。

1.4 性类固醇激素测定

雌二醇(E₂)和睾酮(T)的测定采用放射免疫法(RIA)进行^[5],每个取样月份的雌鱼血浆样品 5~8 个,每个样品设置 3 个平行。使用 ¹²⁵I 标记的哺乳动物 E₂ 和 T 放射免疫测定试剂盒(天津九鼎医学生物工程有限公司)。T 回收率 95%~108%,灵敏度 1.9 ng/dL,批内变异系数 7.4%,批间变异系数 9.8%,其特异性表达为与双羟睾酮交叉反应率 $\leq 1.6\times 10^{-4}$,雄烯二酮 $\leq 2.1\times 10^{-6}$,PROG $\leq 5.0\times 10^{-6}$,E₃(雌三醇) $\leq 5.2\times 10^{-8}$,E₂ $\leq 5.0\times 10^{-4}$ 。E₂ 回收率 95%~104%,灵敏度 2.1 pg/mL,批内变异系数 7.7%,批间变异系数 8.9%,其特异性表达为与 E₃ 交叉反应率 $\leq 9.0\times 10^{-4}$,PROG $\leq 1.0\times 10^{-4}$,TESTO $\leq 1.0\times 10^{-4}$,雌酮 $\leq 7.0\times 10^{-3}$,胆固醇 $\leq 1.0\times 10^{-5}$ 。试剂盒非特异性结合率 $\leq 3\%$,特异性结合率 $\geq 30\%$ 。

1.5 数量特征测量和数据分析

取样过程中对实验鱼进行生物学测量[体质量(BW)、体长(BL)、内脏重(VW)、性腺重(GW)、

肝脏重(LW)]。GSI = (GW/BW - VW)×100; HSI = (LW/BW - VW)×100; CF = [BW/(BL)³]×100,记录数量性状数据用于分析。采用 Duncan's test 和 Tukey test 对 E₂ 和 T 表达水平、GSI 值、HSI 值、CF 值进行单因素方差(ANOVA)分析(SPSS 软件, V16.0),检测各月份间变化差异的显著性;采用偏相关分析和相关分析法检测温度和光周期调控变化与雌二醇、睾酮、GSI、HSI 和 CF 变化的相关性,取差异显著性(P)为 0.05, P≤0.05 视为差异显著,反之不显著。

2 结果与分析

2.1 卵母细胞发育特征及卵巢发育划分

圆斑星鲈卵巢年周期发育过程中,卵巢中可见 2 时相、3 时相、4 时相、5 时相和 6 时相的卵母细胞(图版 I)。根据卵巢的外部形态、卵巢中卵母细胞不同的发育时相、各取样月份样品切片视野中数量或者面积占优势的卵母细胞类型,将卵巢发育划分为 4 个成熟期,6 个发育分期(表 1)。人工养殖条件下的圆斑星鲈亲鱼由于卵母细胞不能达到最终的成熟阶段,性腺发育过程中存在卵母细胞闭锁现象(图版 I-L),约 33.6%,都发生在成熟期的 4 时相后卵母细胞,3 时相前的卵母细胞中未见发现。

人工温光调控下,圆斑星鲈亲鱼性腺在 10~

表 1 养殖圆斑星鲈亲鱼卵巢成熟特征
Tab. 1 Maturity characteristics of the ovaries of captive *V. variegatus* broodstocks

成熟期 maturation stage	发育期 development stage	卵母细胞发育特征 characteristics of oocytes	卵母细胞直径/μm oocyte diameter
成熟前 prematurity	I	卵巢中主要是 2 时相早期卵母细胞,胞质深染为紫色,核和核仁较大,单层滤泡(图版 1-A)。	25.2~68.1
	II	卵巢中主要为处于核仁周期的 2 时相卵母细胞,核仁分布在核膜附近,数量增加,可见 1 个以上卵黄核(图版 1-B)。	51.7~92.5
成熟中 maturing	III	卵母细胞类型包括 2、3、4 时相,3 时相卵母细胞比例高。卵母细胞处于大生长期,皮质液泡出现,卵黄发生开始(图版 1-C,D)。	99.8~245
	IV	卵黄颗粒体积增大,数量增加,卵泡膜崩解,放射膜增厚(图版 1-E,F,G,H),卵母细胞组成为 5、4、3 和 2 时相卵母细胞,4 时相卵母细胞比例高。	422.4~652.8
产卵中 spawning	V	卵母细胞核仁崩解,卵黄颗粒发生不完全水合(图版 1-I,J),卵巢内部可见透明卵粒,适当挤压雌鱼腹部可获部分卵子。卵母细胞组成为 5、4、3 和 2 时相卵母细胞,5 时相卵母细胞比例高。	672.0~937.7
产卵后 postspawning	VI	卵巢退化,腔萎缩,前、中部尚有未成熟卵母细胞和少量未排出的成熟卵子,可见卵母细胞排空后的滤泡膜(6 时相)(图版 1-K),另外,5、4、2 时相卵母细胞同时存在。	—

11 月即可发育至Ⅳ期, 随着温度和光周期的调控卵巢发育进入成熟时期, 1 月可进入繁殖期, 卵巢发育达到Ⅴ期, 但未发现自然产卵现象。亲鱼可使用激素催熟, 采卵期 2~3 个月, 每尾亲鱼可重复采卵 2~3 次。5 月后, 繁殖期结束后性腺退化至Ⅱ期并维持至 8 月。之后随着水温的变化, 性腺发育经历Ⅲ期后继续发育, Ⅲ期卵巢在卵巢整个发育过程中持续时间较短。本研究表明, 圆斑星鲈性腺发育具有明显的周期性且卵母细胞发育具有分批不同步的特性, 产卵属一年一次分批产卵类型。

2.2 卵巢发育的数量形态特征变化

人工养殖及温光调控条件下, 圆斑星鲈 GSI 值在 5 月达到最低值, 在产卵期(1 月, Ⅴ期)时达峰值, 并在 2~3 月份保持较高的 GSI 值(图 2); 5~10 月, HSI 保持相对较低的水平并于 12 月达到峰值(Ⅳ期卵巢), 在产卵期(2~3 月)保持相对较高水平(图 3); 肥满度(CF)在 11 月达到最大值(Ⅳ期卵巢), 并保持较高表达水平至 1 月, 2 月后下降(图 4)。卵巢处于不同发育期时的 GSI、HSI、CF 值的变化见表 2。统计分析显示, GSI 值与 HSI 值存在显著的正相关关系($r=0.871$, $P<0.05$), 与 CF

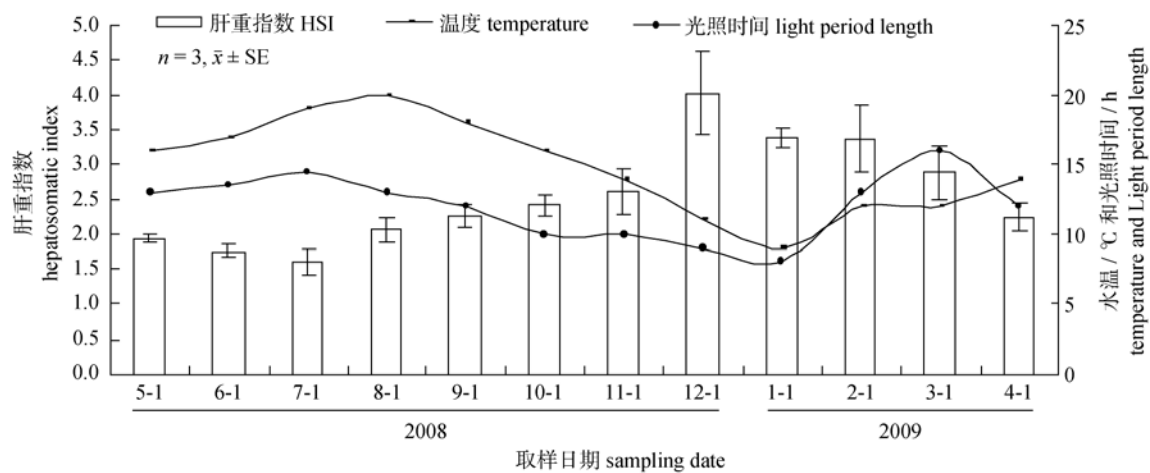


图 2 圆斑星鲈亲鱼性腺指数(GSI)的周年变化

Fig.2 Year round gonadosomatic index (GSI) variation in broodstocks of *V. variegatus*

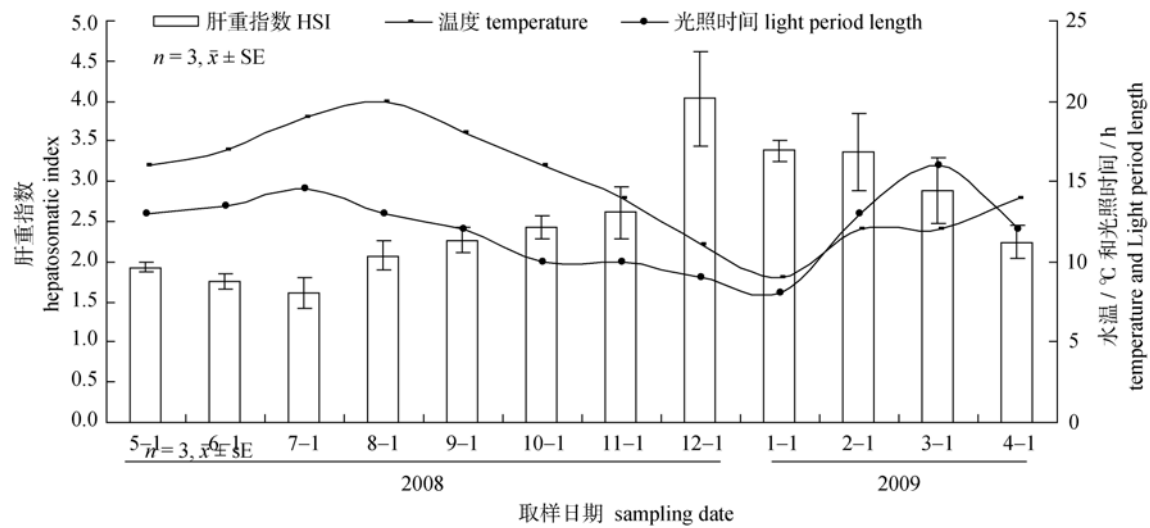


图 3 圆斑星鲈亲鱼肝重指数(HSI)的周年变化

Fig.3 Year round hepatosomatic index (HSI) variation in broodstocks of *V. variegatus*

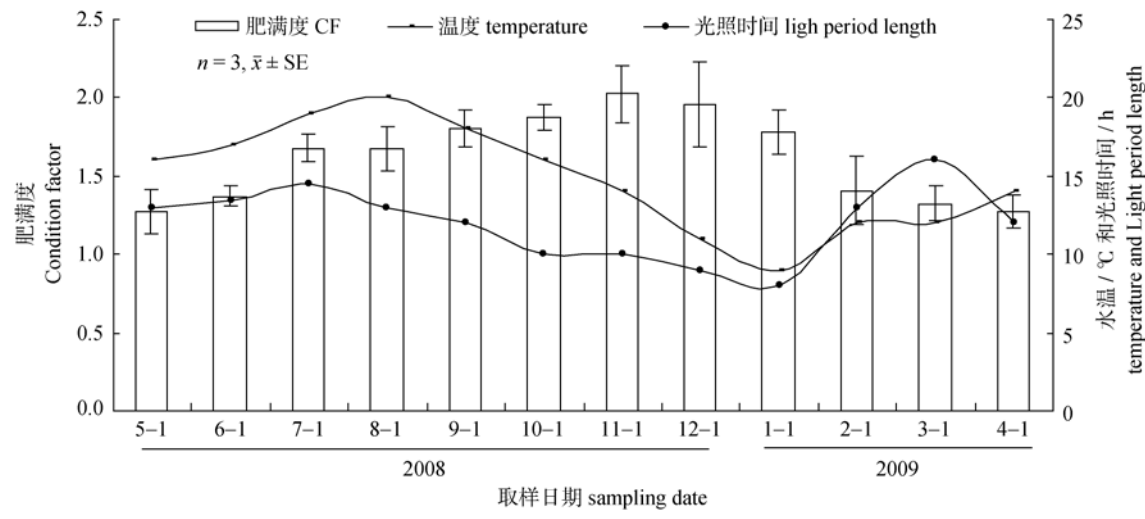


图 4 圆斑星鲈亲鱼肥满度(CF)的周年变化

Fig.4 Year round condition factor (CF) variation in broodstocks of *V. variegatus*

表 2 不同发育期圆斑星鲈亲鱼的 GSI、HSI、CF 表达变化
Tab. 2 Fluctuation of GSI, HSI, CF values in different developmental stages of *V. variegatus*

发育期 development stage	性腺指数 gonadoso- matic index	肝重指数 hepatosomatic index	肥满度 condition factor
I, II	0.86±0.095	1.33±0.094	1.08±0.133
III	7.01±1.185	1.62±0.222	1.70±0.102
IV	21.67±2.859 ^a	3.38±0.152 ^a	1.99±0.211
V	33.09±5.575 ^a	2.62±0.374	1.82±0.149
VI	8.66±0.871	2.24±0.237	1.29±0.125

注: “a”表示与其他发育期相比差异显著($P<0.05$).
Note: “a”means significant difference compared with other development stage ($P<0.05$).

值存在弱的正相关关系($r=0.296$, $P>0.05$)。HSI 值与 CF 值呈现弱的正相关关系($r=0.326$, $P>0.05$)。

2.3 性类固醇激素的周年变化规律

圆斑星鲈雌性亲鱼血浆中雌二醇(E_2)在 11 月份开始升高,并在 1 月份(产卵期, V 期)达到年周期中的峰值,4 月份后降至较低水平至下一个生殖季节(图 5)。统计分析表明,1-3 月的 E_2 值与其他月份差异显著($P<0.05$)。血浆中睾酮(T)的含量在 10 月达到峰值,并在产卵季节保持相对较高的表达水平,并在 4 月后保持相对较低的表达水平至下一个生殖季节(图 6)。统计分析表明,4 月、

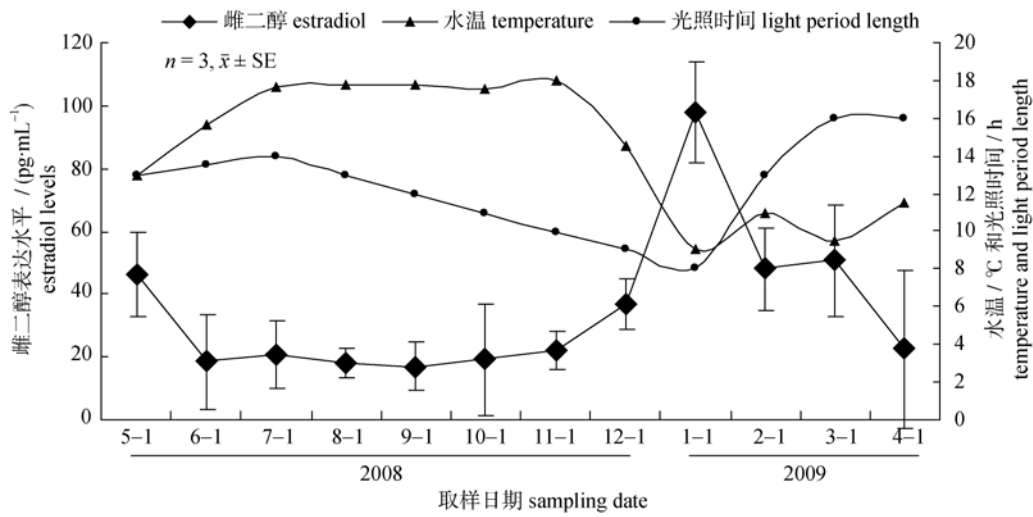


图 5 圆斑星鲈雌鱼血浆中雌二醇的周年变化

Fig.5 Year round changes in serum 17β-estradiol expression levels of *V. variegatus*

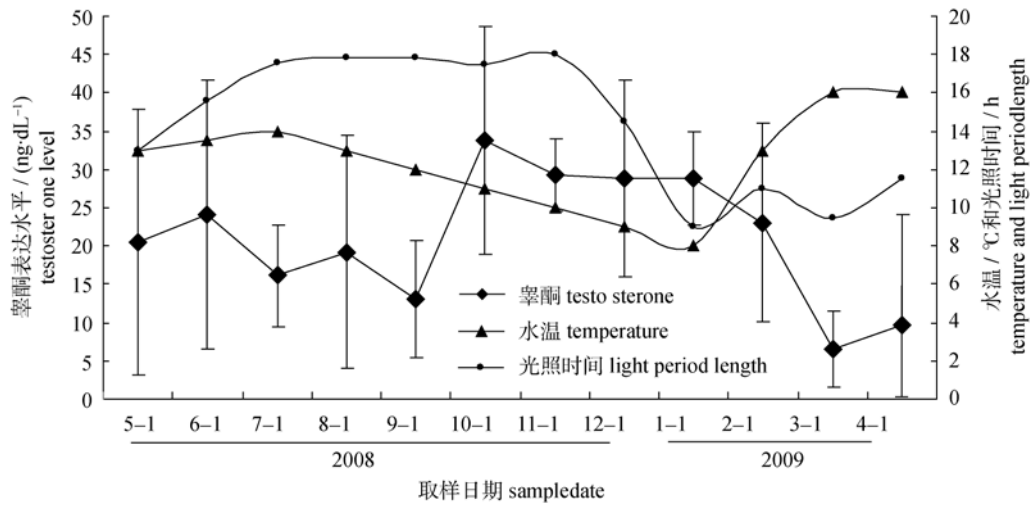


图 6 圆斑星鲈雌鱼血浆中睾酮(T)的周年变化
Fig.6 Year round changes in serum testosterone expression levels of *V. variegatus*

7 月的 T 值与其他月份差异显著($P<0.05$)。E₂ 与 T 的比值在产卵期达较高比值。统计分析表明, E₂ 与 T 存在弱的正相关关系($r=0.147$, $P>0.05$), 与 GSI 值的变化呈显著的正相关关系($r=0.795$, $P<0.05$), 同时与 HSI 值变化呈较强的正相关关系($r=0.567$, $P>0.05$), 而与 CF 值的变化呈弱的负相关关系($r=-0.096$, $P>0.05$)。不同发育期 E₂ 和 T 的表达水平变化见表 3。

2.4 温光调控与卵巢发育成熟及性类固醇激素表达水平的关系

采用线性相关分析和偏相关分析方法, 得知 GSI 值的变化与光周期调控呈弱的负相关关系 ($r = -0.203$, $P>0.05$), 而与水温调控呈显著的负相

关关系($r = -0.783$, $P<0.05$), 提示水温可能是促进性腺发育的更为重要环境因子。HSI 值的变化与光周期调控呈负相关关系($r = -0.371$, $P>0.05$), 而与水温调控呈显著的负相关关系($r=-0.8$, $P<0.05$); CF 值的变化与水温调控呈正相关关系($r = 0.437$, $P>0.05$), 而与光周期调控呈显著的负相关关系($r = -0.744$, $P<0.05$)。E₂ 与水温变化存在显著的负相关关系($r = -0.821$, $P<0.05$)而与光周期调控存在显著的负相关关系($r = -0.93$, $P<0.05$)。T 与水温变化呈显著的负相关关系($r = -0.821$, $P<0.05$)而与光周期调控呈弱的正相关关系 ($r=0.262$, $P>0.05$)。

3 讨论

3.1 圆斑星鲈产卵类型及卵母细胞发育成熟模式
圆斑星鲈卵巢发育属非同步分批成熟类型, 产卵属一年一次分批产卵类型, 与其他已报道的海水硬骨鱼类如漠斑牙鲆(*Paralichthys lethotigme*)^[4]和半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)^[6]等一致。在圆斑星鲈所有发育期的卵巢横切面上, 都可以发现占有较高比例的 II 时相卵母细胞的存在, 表明卵巢中卵母细胞发育的可持续性和潜能^[7]。发生闭锁的卵母细胞可能为上个产卵季节未能排出也未能吸收的卵母细胞^[8], 也可能是由于人工操作如产卵诱导、挤压采卵^[9]或者受到环境胁迫

表 3 圆斑星鲈不同发育期血浆中性类固醇激素的表达
Tab.3 Serum sex steroids levels in different development stages

发育期 development stage	性类固醇激素 sex steroids	
	雌二醇/ (pg·mL ⁻¹)estradiol	睾酮/ (ng·dL ⁻¹)testosterone
II	46.18±13.62	20.55±17.07
III	51.65±18.78	19.53±9.12
IV	41.85±6.04	29.22±4.77
V	96.78±16.38 ^a	23.06±3.69
VI	37.62±5.16 ^b	9.71±4.29 ^a

注: “a”表示不同发育期之间差异显著($P<0.05$), “b”表示差异极显著($P<0.01$).
Note: “a” means significant difference between different development stage ($P<0.05$); “b” means $P<0.01$.

引发^[10]。今后,亲鱼培育过程中,应优化亲鱼培育的环境因子调控措施,尽量减少环境胁迫,促进亲鱼成熟率和产卵效率。卵母细胞发生水合作用是其成熟即将排出的标志,这在大西洋牙鲆(*Paralichthys dentatus*)^[41]、美洲拟庸鲽[(*Hippoglossoides platessoides* (Fabricius))]^[1]等种类中均有报道。Kjesbu^[11]认为,发生水合作用的卵母细胞排放到卵巢腔内后将停留一段时间才产出体外,这是吸水膨胀的过程熟化的过程。在实际生产中,圆斑星鲽亲鱼尚不能自然产卵且人工采集卵子同样存在困难,表明卵母细胞可能无法经历最终成熟的阶段而自然排放到卵巢腔内。在外源激素诱导的情况下,人工采集卵子相对容易,可能是外源激素诱导内分泌系统完成生理功能,卵母细胞的最终成熟达到排卵。

3.2 血浆性类固醇激素表达与卵巢发育特征的关系

性类固醇激素由卵巢分泌,促进卵母细胞发育成熟,同时肝脏合成卵母细胞卵黄的前体物质卵黄蛋白原的过程受到性类固醇激素的调控^[12]。在很多硬骨鱼类中已经证明,性类固醇激素表达变化与性腺发育的季节变化或者 GSI 密切相关^[13]。本研究显示,不同季节血浆中 E_2 的表达水平与 GSI 变化呈现一致的变化趋势,同时与 GSI 值的变化呈显著的正相关关系($P<0.05$),揭示了卵巢分泌性类固醇激素水平与其生长发育具有正反馈的密切联系。HSI 值是反映亲鱼的摄食情况和肝脏卵黄蛋白原合成的动态变化的重要指标,与卵黄发生关系密切^[14]。本研究发现,圆斑星鲽的 HSI 值在卵巢发育至Ⅳ期达到峰值,并在Ⅴ期卵巢保持较高水平,这对于卵母细胞的分批发育成熟所需的能量持续供应具有重要的生理学意义。另外, GSI 值与 HSI 值存在显著的正相关关系($P<0.05$),提示卵巢中卵母细胞的生长发育与肝脏能量供应间存在极为紧密的应答和传递关系。同时,血浆中 E_2 的表达水平与 HSI 值变化呈较强的正相关关系($P>0.05$),验证了卵巢发育过程中雌二醇在肝脏合成卵黄蛋白原中的促进作用。圆斑星鲽 CF 在卵巢发育至Ⅳ期时达到峰值,在产卵结束后的Ⅵ期, CF 降低,这与大西洋庸鲽(*Hippoglossus*

hippoglossus) 在繁殖期的肥满度变化趋势相同^[15]。统计分析显示,血浆 E_2 表达水平与 CF 值的变化呈弱的负相关关系($P>0.05$),而 HSI 值与 CF 值呈现弱的正相关关系($P>0.05$),这些结果表明亲鱼的体能量储备可能通过其他的通路间接作用于性类固醇激素表达从而促进性腺发育成熟,在圆斑星鲽亲鱼培育过程中,加强亲鱼的营养强化调控是产卵是否成功的重要步骤之一。

本研究发现,圆斑星鲽亲鱼血浆 E_2 表达水平在产卵期达到峰值,这与其他多次产卵类型鱼类不同^[16],可能是由于内分泌系统的环境适应机制的差异引起。另外,亲鱼血浆中 E_2 表达水平在产卵期间明显下降,这可能与诱导卵母细胞最终发育成熟的促成熟激素(MIH, 如 17α , 20β -双羟孕酮)等的表达升高密切相关^[17],其在性腺成熟前期大量参与卵母细胞卵黄累积过程和转化为 17α , 20β -双羟孕酮储存而消耗^[13]。圆斑星鲽亲鱼血浆性类固醇激素表达水平变化与性腺发育成熟度呈现明显的协同效应,当卵母细胞中卵黄蛋白开始积累时,血浆中类固醇激素显著上升,表明 BPG 轴对环境刺激的响应机制的激活启动^[4]。本研究中,血浆中 E_2 的表达水平随着性腺发育成熟而升高并伴随着产卵的进行其表达水平逐渐降低,组织学观察到卵巢中成熟卵母细胞比例增加,直接证明 E_2 在促进卵母细胞成熟方面具有重要生理功能,这与欧川鲽(*Pleuronectes platessa*)的研究结果一致^[18]。

本研究中,亲鱼血浆中 T 表达水平的峰值出现时间早于 E_2 峰值出现的时间,并在产卵期间保持相对较高的表达水平,产卵末期后逐渐下降并保持较低的水平至下一个繁殖周期,这种表达变化规律的可能机理:为保证卵母细胞的分批发育成熟,血浆中需保持一定水平的 E_2 ,因此在芳香化酶的介导下,较高水平的 T 含量可为不断转化为 E_2 提供保障^[19]。研究表明,卵母细胞的最终成熟除需要某些成熟促进激素(MIS)的调节外,需维持血浆 T 表达水平在一定的阈值之上^[20],其可能的机理是 T 在维持卵母细胞卵黄发生完成或者增强促性腺激素释放激素刺激垂体在排卵前增强

向血浆分泌促黄体素(LH)方面具有重要作用。因此, 如果血浆中T表达低于适宜水平的话, LH的分泌可能就会不足而导致卵母细胞发育障碍^[21]。本研究发现, 雌鱼性腺发育过程中, 血浆T表达水平一直低于E₂的表达水平, 也有报道称雌鱼性腺发育过程中血浆中T和E₂表达水平一致^[13], 关于雌鱼血浆中T和E₂表达水平的关系, 目前尚未有定论。但在本研究中, 血浆T含量相对较低, E₂/T的比值相对较高可能是造成卵巢中卵母细胞闭锁的一种机制, 这在其他鱼种中也有报道^[10]。

3.3 卵巢成熟、血浆性类固醇激素表达与水温、光周期调控的关系

在自然环境下繁殖, 亲鱼性腺的发育依赖于自然环境因子的变动。其中, 水温和光周期是启动硬骨鱼类BPG轴生理功能, 调控卵子最终发育成熟的决定因素^[22]。对已有研究证明, 如果外界环境因子调控失利, 可造成垂体分泌促成熟的促性腺激素-促黄体素的失败^[2], 从而导致性类固醇激素分泌不足, 卵母细胞无法达到最终成熟而不能排出体外。本研究中, 圆斑星鲈亲鱼可经历卵母细胞发育的各个时期并达到V时相的水合期, 但即使在激素催产下亲鱼也无法达到自然产卵, 这种现象表明人工养殖环境可能缺少自然环境中对亲鱼卵巢发育成熟和排卵期决定作用的环境因素, 这在其他鱼种中同样存在^[21]。Dinis等^[23]对塞内加尔鲷的研究结果表明, 通过水温的调控亲鱼可自然产卵, 且血液中性类固醇激素表达水平与水温调控密切相关, 同时, 未经精确温光调控未能产卵的亲鱼血浆中E₂和T呈现相对较低的表达水平^[24], 表明良好的温光调控措施是获得产卵的必要因素。适宜的光周期调控是促进亲鱼性腺发育成熟产卵的另一重要保障^[25], 如在大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)中, 适宜的光周期调控可获得反季节的产卵和良好的产卵效果^[26]。研究表明, 卵巢年周期发育过程中, E₂表达水平与水温 and 光周期调节都成显著的相关关系, 表明E₂的发生和表达受到光周期和水温的双重调控的显著影响, 亲鱼卵母细胞发育达到了水合期, 并在激素诱导下获得了发育良好的卵子和受精卵, 这

表明本研究使用的温度和光周期措施较为适宜人工养殖条件下圆斑星鲈亲鱼的促熟催产。同时, 统计分析表明E₂与GSI呈显著的正相关关系, 而GSI值的变化仅与水温调控呈显著的负相关关系, 而与光周期调控呈弱的负相关关系。本研究还显示, HSI值与光周期调控呈负相关关系($P>0.05$), 而与水温调控呈显著的负相关关系($P<0.05$), 进一步提示水温在调控肝脏能量积累和卵巢持续发育中的联动作用。CF值的变化与水温调控呈正相关关系($P>0.05$), 而与光周期调控呈显著的负相关关系($P<0.05$), 这表明光周期的调控对于亲鱼的营养积累具有重要的促进作用。这些结果提示水温可能通过直接通路作用于卵巢发育, 而光周期可能通过内分泌系统而间接作用于卵巢发育成熟^[2]。有关水温和光周期与圆斑星鲈性腺发育成熟产卵的关系, 尚有待于深入研究。

综合本研究结果, 圆斑星鲈雌性亲鱼血浆性类固醇激素表达水平变化与性腺发育(卵母细胞成熟)、水温等具有显著的相关关系, 根据BPG轴作用原理, 这些结果可作为温光调控人工亲鱼性腺发育成熟、激素诱导亲鱼产卵的重要参考技术依据。

参考文献:

- [1] Maddock D M, Burton P M. Gross and histological observations of ovarian development and related condition changes in American plaice [J]. J Fish Biol, 1999, 53: 928-944.
- [2] Zohar Y, Mylonas C C. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes [J]. Aquaculture, 2001, 197: 99-136.
- [3] Nagahama Y. Gonadal steroid hormones: major regulators of gonadal sex differentiation and gametogenesis in fish [M]. In: Norberg B, Kjesbu O S, Taranger G L, et al. Reproductive Physiology of Fish. John Grieg Forlag AS, Bergen, 2000: 211-222.
- [4] Merson R R, Casey C S, Martinez C, et al. Oocyte development in summer flounder: seasonal changes and steroid correlates [J]. J Fish Biol, 2000, 57: 182-196.
- [5] 林浩然, 刘晓春. 鱼类生理学实验技术和方法[M]. 广州: 广东高等教育出版社, 2007: 80-86.
- [6] 柳学周, 徐永江, 刘乃真, 等. 半滑舌鳎卵巢发育的组织

- 学和形态数量特征研究[J]. 渔业科学进展, 2009(3): 25–35.
- [7] Arocha F. Oocyte development and maturity classification of swordfish from the north-western Atlantic Ocean[J]. J Fish Biol, 2002, 60: 14–27.
- [8] Wallace R A, Boyle S M, Grier H J, et al. Preliminary observations on oocyte maturation and other aspects of reproductive biology in female snook, *Centropomus undecimalis*[J]. Aquaculture, 1993, 116: 257–73.
- [9] Wallace R A, Selman K. Physiological aspects of oogenesis in two species of sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus* (L.) and *Apeltes quadracus* (Mitchill) [J]. J Fish Biol, 1979, 14: 551–64.
- [10] Clark R W, Henderson-Arzapalo A, Sullivan C V. Disparate effects of constant and annually-cycling daylength and water temperature on reproductive maturation of striped bass (*Morone saxatilis*)[J]. Aquaculture, 2005, 249: 497–513.
- [11] Kjesbu O S, Klungsoyr J, Kryvi H, et al. Fecundity, atresia, and egg size of captive Atlantic cod (*Gadus morhua*) in relation to proximate body composition [J]. Can J Fish Aqu Sci, 1991, 48: 2333–2343.
- [12] Specker J L, Sullivan C V. Vitellogenesis in fishes: status and perspectives, In Davey, K.G., Peter, R.E. and Tobe, S.S., eds. Perspectives in Comparative Endocrinology [M]. Ottawa, Canada: National Research Council of Canada, 1994, 304–15.
- [13] Comeau L A, Campana S E, Chouinard G A, et al. Timing of Atlantic cod *Gadus morhua* seasonal migrations in relation to serum levels of gonadal and thyroidal hormones[J]. Mar Ecol Prog Ser, 2001, 221: 245–253.
- [14] Tyler C R, Sumpter J P. Oocyte growth and development in teleosts [J]. Rev Fish Biol Fish, 1996, 6: 287–318.
- [15] Zamarro J. Feeding behavior of the American plaice (*Hippoglossoides platessoides*) on the southern Grand Banks of Newfoundland[J]. Netherlands J Sea Res, 1992, 29: 229–238.
- [16] Methven D A, Crim L W, Norberg B, et al. Sexual reproduction and plasma levels of sex steroids and vitellogenin in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*)[J]. Can J Fish Aquat Sci, 1992, 49: 754–759.
- [17] Mylonas C C, Scott A P, Zohar Y. Plasma gonadotropin II, sex steroids, and thyroid hormones in wild striped bass (*Morone saxatilis*) during spermiation and final oocyte maturation[J]. Gen Compar Endocrinol, 1997, 108: 223–236.
- [18] Scott A P, Withames P R, Turner R J, et al. Plasma concentrations of ovarian steroids in relation to oocyte final maturation and ovulation in female plaice sampled at sea[J]. J Fish Biol, 1998, 52: 128–145.
- [19] Chang C F, Hung C Y, Chiang M C, et al. The concentration of plasma sex steroids and gonadal aromatase during controlled sex differentiation in grey mullet, *Mugil cephalus*[J]. Aquaculture, 1999, 177:37–45.
- [20] Patiño R, Yoshizaki G, Thomas P, et al. Gonadotropic control of ovarian follicle maturation: the two-stage concept and its mechanism[J]. Comp Biochem Physiol B, 2001, 129: 427–439.
- [21] Pankhurst N W, Porter M J R. Cold and dark or warm and light: variations on the theme of environmental control of reproduction[J]. Fish Physiol Biochem, 2003, 28: 385–389.
- [22] Holland M C, Hassin S, Zohar Y. Seasonal fluctuations in pituitary levels of the three forms of gonadotropin-releasing hormone in striped bass, *Morone saxatilis* (Teleostei), during juvenile and pubertal development [J]. J Endocrinol, 2001, 169: 527–538.
- [23] Dinis M T, Ribeiro L, Soares F, et al. A review on the cultivation potential of *Solea senegalensis* in Spain and in Portugal [J]. Aquaculture, 1999,176: 27–38.
- [24] García-López A, Anguis V, Couto E, et al. Non-invasive assessment of reproductive status and cycle of sex steroid levels in a captive wild broodstock of Senegalese sole *Solea senegalensis*[J]. Aquaculture, 2006, 254: 583–593.
- [25] Bromage N, Porter M. The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin [J]. Aquaculture, 2001, 197: 63–98.
- [26] Imsland A K, Folkvord A, Jónsóttir Ó D B, Stefansson S O. Effects of exposure to extended photoperiods during the first winter on long-term growth and age at first maturity in turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. Aquaculture, 1997, 159: 125–141.

Annual gonadal maturation cycle of captive spotted halibut, *Verasper variegatus*: correlation with serum sex steroids and photothermal regulation

XU Yongjiang^{1,2}, LIU Xuezhou^{1,2}, WANG Qingyin^{1,2}, ZHAO Ming^{1,2}, QU Jianzhong³

1. Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resource, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

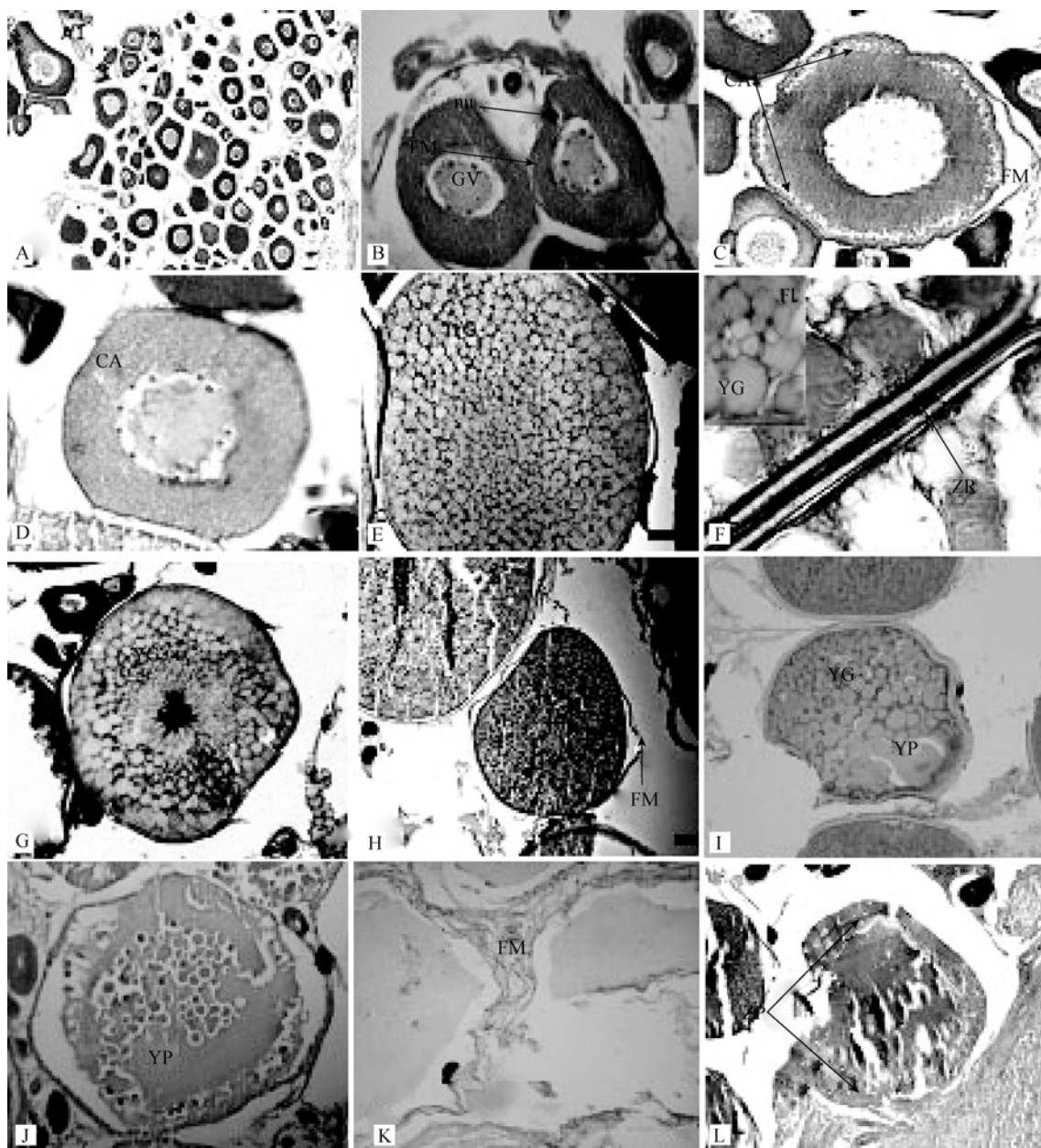
2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Qingdao 266071, China;

3. Qingdao Zhonghai Fishery Co. Ltd., Qingdao 266414, China

Abstract: We documented the annual ovarian maturation cycle and measured serum sex steroids levels in the spotted halibut, *Verasper variegatus*, using histological and morphometric methods and radioimmunoassay. In addition, we analyzed the relationship between the gonadosomatic index (GSI), condition factor (CF), hepatosomatic index (HSI), sex steroid levels and temperature or photoperiod. Oocyte development was asynchronous and the halibut exhibited batch spawning behavior. We divided oocyte growth in sexually mature females into five phases. Similarly, the ovarian maturation cycle was divided into four stages. GSI, HSI, and CF all increased prior to, or during the peak phase of vitellogenic growth corresponding to gonad development. The GSI was positively correlated with HSI and CF. Temperature had a greater influence on gonad maturation (GSI and HSI) than photoperiod. The level of serum estradiol began to increase in November and peaked in January, thereafter decreasing to a relatively low level until the following reproductive cycle. The level of serum testosterone peaked in October, two months earlier than that of the peak in estradiol. We found a positive relationship between the levels of estradiol and testosterone. Both temperature and photoperiod had a significant positive effect on levels of serum estradiol, which was also positively correlated with GSI and HSI. In addition, temperature and photoperiod had a significant effect on HSI and CF, respectively. Our results provide insight into the physiological and endocrine mechanisms controlling the annual reproductive cycle of captive female spotted halibut brood. In addition, our observations provide guidance for broodstock programs and for the determining the optimal timing for hormone induced spawning.

Key words: *Verasper variegatus*; ovary maturation cycle; sex steroid; photothermal regulation

Corresponding author: LIU Xuezhou. E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn



图版 I 不同时相卵母细胞形态特征

A - 2 时相早期: 卵母细胞形状不规则, 核仁大。B - 2 时相晚期(核仁周期): 胞质中卵黄核(nu), 示生殖泡(GV), 单层滤泡膜(FM)。C - 3 时相早期: 皮质液泡(CA)生成, 滤泡膜变为双层。D - 3 时相晚期: 液泡(CA)增多, 放射膜(ZR)形成。E - 4 时相早期: 卵黄颗粒(YG)充满胞质, 示滤泡膜(FM)。F - 放射膜: 示放射膜(ZR)和卵黄球(YG)。G - 4 时相中期: 卵黄颗粒(YG)。H - 4 时相晚期: 核偏位(GV), 移向胞质的边缘, 核膜崩解。I - 5 时相早期 卵黄颗粒开始融合为卵黄板(YP)。J - 5 时相晚期: 卵黄板(YP)体积增大。K - 排空后的滤泡细胞: 卵母细胞排空后的滤泡膜(FM)。L - 发生闭锁的卵母细胞, 示增生的放射膜。标尺代表 50 μm

CA: 皮质液泡; FM: 滤泡膜; GV: 胚泡; nu: 卵黄核; YG: 卵黄球; YG: 卵黄板; ZR: 放射膜

Plate I Morphological characteristics of oocyte in different developmental stages

A. Oocyte of early phase II, showing varied shape of oocyte and big nucleolus (n). B. Oocyte of late phase II (perinucleolus stage), showing yolk nucleus (nu) and germinal vesicle (GV). C. Oocyte of early phase III, show cortical alveoli (CA) and double layered follicle membrane (FM). D. Oocyte of late phase III, cortical alveoli (CA) increased in number and zona radiata formed. E. Oocyte of early phase IV, show yolk globules (YG), follicle membrane (FM). F. Zona radiata (ZR). G. Oocyte of mid phase IV, yolk globules (YG) increased. H. Oocyte of late phase IV, position of the nucleus started to migrate towards the animal pole, nucleus membrane collapsed. I. Oocyte of early phase V, incipient coalescence of yolk globules started. J. Oocyte of late phase V, yolks plate volume enlarged. K. Rudimentary follicle membrane (FM) after spawning. L. Oocyte with atresia. Bar stands for 50 μm . CA: cortical alveoli; FM: Follicle membrane; GV: Germinal vesicle; nu: yolk nucleus; YG: yolk globules; YG: yolk globules; ZR: zona radiata.