

文章编号: 1000-0615(2019)07-1569-12

DOI: 10.11964/jfc.20180611335

温度对许氏平鲷性腺分化的影响及其机制

张思敏, 王孝杰, 李吉方*, 温海深, 吕里康

(中国海洋大学, 海水养殖教育部重点实验室, 山东青岛 266003)

摘要: 本研究以许氏平鲷为实验对象, 设置3组不同温度, 即高温组(24 °C)、对照组(20 °C)和低温组(16 °C), 利用组织切片技术、酶联免疫法(ELISA)和实时荧光定量PCR(qRT-PCR)等技术探究温度对许氏平鲷性腺分化的影响及其潜在机制。结果显示, 在40 dpb时, 24 °C下性腺发育最快, 16 °C下最慢, 24 °C、20 °C和16 °C下雌性率分别为70.0%、42.9%和33.3%。24 °C和20 °C下, E₂在较高水平持续时间较长, T水平在30~35 dpb时急剧降低, 16 °C下的E₂水平迅速下降, 35 dpb时T仍处于较高水平, 说明在性腺分化期间, 温度较高时, E₂水平较高, T水平较低, 性腺偏雌性发育; 反之, 性腺偏雄性发育。在24 °C下, 35~40 dpb时的*cyp19a1a* mRNA的表达显著上调, 可能与高温导致性腺分化偏雌性发育有关; 在16 °C下, 30~50 dpb时*ERβ2* mRNA的表达显著下调, 说明*ERβ2*的表达被抑制可能与性腺偏雄性发育有关; 24 °C和20 °C下, *foxl2* mRNA的表达在25~35 dpb时处于较高水平, 而低温组在30 dpb时表达水平开始上升, 说明*foxl2*在性腺分化早期的高表达水平可能与卵巢分化的速率有关; 在30~50 dpb, *sox3*、*sox9*和*dmrt1*的表达水平变化总趋势基本一致, 说明三者之间的表达有一定的联系, 可能与精巢的分化速率有关。

关键词: 许氏平鲷; 温度; 性腺分化

中图分类号: Q 132.1; S 965.3

文献标志码: A

鱼类的性腺分化包括两个方面: 细胞学和解剖学(组织学)。解剖学方面, 性腺分化的标志包括是否有卵巢腔的形成, 是否出现输精管、微血管的位置、原始性腺的大小和形状以及原始生殖细胞(primordial germ cell, PGC)数目等^[1-2]。在硬骨鱼类的性腺分化中, 一般卵巢先分化, 精巢后分化。卵巢分化的主要标志是卵巢腔的形成, 同时也是解剖学上性腺分化开始的标志。一般的, 将生殖细胞减数分裂的开始作为细胞学上性腺分化的标志, 但很多鱼类发育到生殖细胞减数分裂这一时期历时较长^[3]。

作为低等脊椎动物的鱼类, 其性别决定与分化除了受遗传型性别决定(genetic sex determination, GSD)外, 还存在环境型性别决定(environmental sex determination, ESD)^[4]。影响鱼类性别分化的

环境因子主要包括温度、光周期、pH值、盐度、种群密度等^[5]。其中温度是最主要的影响因子, 也是人们研究较多的一种。据报道, 鱼类的温度依赖型性别决定(temperature-dependent sex determination, TSD)可以划分为三种类型^[6]: 一是在高温下产生雄性较多, 低温产生雌性较多, 大部分鱼类均属于此种类型, 比如舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*)、泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)和金鱼(*Carassius auratus*)等^[7-9]; 第二种则与之相反, 比如斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)和鲫等^[10-11], 在高温下产生雌性较多, 低温产生雄性较多; 三是在高温和低温下, 产生的均为单性雄性, 中间温度性比为1:1, 比如牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)和半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)等^[12-13]。

鱼类的性别分化及发育以遗传因素为基础,

收稿日期: 2018-06-25 修回日期: 2019-01-03

资助项目: 国家自然科学基金(41676126)

通信作者: 李吉方, E-mail: lijf@ouc.edu.cn

同时受到外界环境以及自身内分泌调节的影响,三者共同作用,因此鱼类的性别决定机制复杂多变^[14]。目前,鱼类的性别决定机制的研究逐渐成为热点,其中性腺分化相关基因的研究主要集中在芳香化酶基因、*sox9*、*dmrt1*基因上,*ERα*、*ERβ2*、*AR*等核受体基因,*foxl2*、*sox3*、*amh*和*Tra2*等基因的相关报道也逐渐增多^[15]。

本研究在卵胎生许氏平鲈(*Sebastes schlegelii*)性腺分化时期进行不同温度处理实验,利用组织学切片技术观察其性腺分化与发育情况,探究了温度对许氏平鲈性腺分化的影响。同时,通过测定性类固醇激素水平和性别分化相关基因的表达情况,探究了不同温度对性腺分化影响中的潜在机制。旨在为卵胎生鱼类性腺分化的研究提供一定的理论依据,同时为环境调控鱼类性腺分化技术的研发提供一定的资料,并对许氏平鲈养殖生产提供一定的理论指导。

1 材料与方法

1.1 实验对象

本实验所用许氏平鲈仔稚鱼来自山东东营利津县双瀛水产苗种有限责任公司。

1.2 实验设计

取自自然条件下养殖的21日龄(day post birth, dpb)许氏平鲈仔鱼进行实验,设置3组,分别为高温组(24 °C)、对照组(20 °C)和低温组(16 °C)。每天升高或降低1 °C,4 d内逐渐升温或降温至设定温度,其他条件不变。每天投喂卤虫无节幼体,30 dpb时投喂卤虫无节幼体+配合饲料;40 dpb以后投喂配合饲料。25~50 dpb取样(实验鱼全长为8.6~37.3 mm),每隔5 d取样1次,每次随机取20尾鱼测量全长,随机取10尾于波恩氏液中,全鱼固定保存,取10尾于液氮中快速冷冻,-80 °C保存,备用。

1.3 组织切片及观察

许氏平鲈仔鱼全鱼经过波恩氏液固定24 h后,经梯度酒精脱水,二甲苯透明、浸蜡,石蜡包埋,待石蜡凝固后修整蜡块,LEICA-RM201型切片连续切片,切片厚度为7 μm,全鱼纵切,展片,38 °C烘箱烘干,进行苏木精-伊红染色(H.E染色),中性树脂封片,晾干。显微镜下观察并拍照,同时测量性腺和PGC的大小,统计性别比例。

1.4 许氏平鲈仔稚鱼雌二醇(E₂)和睾酮(T)含量的测定

由于许氏平鲈仔稚鱼太小,无法抽取血液,故采用全鱼组织匀浆用于激素测定。每个时期5尾,3个平行,每1尾鱼为一个样本进行检测。利用酶联免疫法(ELISA)测定许氏平鲈仔稚鱼全鱼组织匀浆中的E₂和T含量,该试剂盒回收率为95%~104%,与其他相似物质无明显交叉反应。本实验所用试剂盒来源于上海酶联生物科技有限公司。利用酶标仪(SoftMax Prot 6.5-1软件)在450 nm波长下测定吸光度(OD值),通过拟合标准曲线计算许氏平鲈仔稚鱼全鱼组织匀浆中E₂和T的浓度。

1.5 许氏平鲈全鱼总RNA的提取和cDNA文库的构建

运用Trizol法提取许氏平鲈全鱼总RNA,每个时期5尾,利用核酸测定仪测定全鱼总RNA的浓度,以备反转录。同时进行琼脂糖凝胶电泳,检测RNA的完整性。取0.5~1.0 μL的总RNA(根据所得到的RNA浓度计算而定),使用PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser试剂盒(TaKaRa,日本)去除基因组DNA,并反转录为cDNA,-80 °C保存备用。

1.6 许氏平鲈仔稚鱼性别分化相关基因表达分析

利用Primer 5软件设计引物,所用的基因序列*cyp19a1a*(FJ594995.2)、*ERβ2* (HQ452829.1)、*foxl2*(JN998083.1)均来源于GenBank,*ERα*、*sox9*、*amh*、*sox3*和*dmrt1*的基因序列均来源于许氏平鲈转录组数据(NCBI:SRR4409372)。设计成功的引物由华大基因Oligo进行合成,引物序列如表1所示。

对样品cDNA进行4倍梯度稀释,每个时期5尾鱼的cDNA混为一个样本,设置3个平行,进行实时荧光定量PCR(qRT-PCR)。反应体系(共20 μL):SYBR Premix Ex Taq 10 μL、上下游引物各0.4 μL、cDNA模板2.0 μL、ddH₂O 6.8 μL。上机程序,预变性:95 °C,30 s;PCR反应:95 °C,5 s;X °C(X为目的基因或内参基因的退火温度,本实验中,*amh*和*ERα*退火温度为60 °C,*ERβ2*、*sox9*和*dmrt1*为58 °C,*cyp19a1a*、*foxl2*和*sox3*为56 °C)30 s,共40个循环;熔解曲线生成:95 °C,15 s;60 °C,1 min;95 °C,15 s为1个循环。建立标准

表 1 基因表达分析的特异性引物

Tab. 1 Primer sequences for mRNA expression analysis

引物名称 primers	核苷酸序列 sequence(5'—3')
<i>cyp19a1a</i>	Forward: ACCTGGACAGTTTGGCTCA Reverse: GAGGCAGTCCAAGTAAGG
<i>ERβ2</i>	Forward: GCCACGGACCTTAACCT Reverse: GACTTCCTCTGACCTCTT
<i>foxl2</i>	Forward: CAAGAAAGGTTGGCAGAA Reverse: GTAGGACATCGAGTGGG
<i>ERα</i>	Forward: CCTGACGCAGAGCAAGCA Reverse: GAGTCCAGAGGAGCAGAGTA
<i>sox9</i>	Forward: AGAGGCTCCTCCATCCG Reverse: AGCAGCCAGACTCAGAC
<i>amh</i>	Forward: AGCCTCACCGTGTCCCTA Reverse: TCCCGTGTTCGTCAAGTC
<i>sox3</i>	Forward: CTGCTGCGTGGTGGTGTA Reverse: CCTCATCAGCACCATAGCA
<i>dmr1</i>	Forward: TGGAGGCTATCATCACGG Reverse: CAGGCAACTCTTCATTCTTA
<i>β-actin</i>	Forward: TGGAGGCTATCATCACGG Reverse: CAGGCAACTCTTCATTCTTA

曲线, 以 β -actin为内参基因, 根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算得到性腺分化相关基因mRNA的相对表达量。

1.7 数据处理

实验数据采用SPSS 19.0统计软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA), 探究不同时间点间和各组间数据的差异显著性。在假定方差齐性的条件下, 作Tukey-HSD多重比较分析, 若不满方差齐性, 采用Games-Howell法。利用Excel(2007版)绘制图表, 所得数据均用平均值 \pm 标准误(mean \pm SE)表示, 在 $P < 0.05$ 时为差异显著。

2 结果

2.1 温度对许氏平鲈性腺分化的影响

25 dpb时, 高温组、对照组和低温组的许氏平鲈仔鱼平均全长分别为(12.6 \pm 0.5)mm、(10.8 \pm 0.2)mm和(9.3 \pm 0.6)mm。在3组处理下, 可观察到1对发育较为完整的原始性腺悬挂于中肾管和肠道之间的体腔膜上。在24 $^{\circ}$ C(高温组)下, 原始性腺大小出现明显的差别, 大的约56.3 μ m \times 22.1 μ m, 小的约29.6 μ m \times 21.4 μ m, 将来可能会发育为卵巢; 同时, 可以观察到2个明显的PGC, 一般呈圆形, 体积较大, 直径约10.2~10.6 μ m, 核仁明显。对照组(20 $^{\circ}$ C)和低温组(16 $^{\circ}$ C)的性腺呈圆棒状, 体积较小, 性腺大小分别约为42.1 μ m \times 18.2 μ m和25.2 μ m \times 9.7 μ m (图版 I)。

40 dpb时, 高温组、对照组和低温组的许氏平鲈仔鱼平均全长分别为(25.4 \pm 0.4)mm、(22.7 \pm 0.5)mm和(15.6 \pm 0.3)mm。高温组和对照组中的一

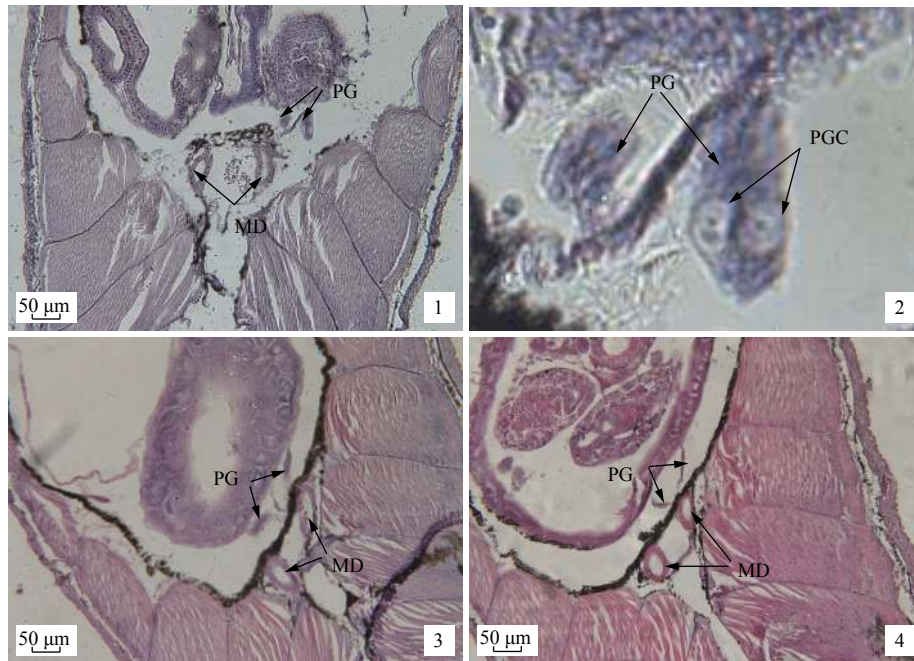
类性腺有微血管深入, 且出现裂隙, 将来可能会发育为卵巢腔, 这标志着性腺分化已经开始, 这类性腺将来可能发育为卵巢, 初步鉴定为卵巢; 另一类性腺呈梨形或椭圆形, 没有出现裂隙, 将来可能发育为精巢, 初步鉴定为精巢。高温组的许氏平鲈卵巢和精巢发育最快, 大小分别约为133.1 μ m \times 32.2 μ m和76.2 μ m \times 15.8 μ m, 卵巢腔裂隙更为明显; 对照组(20 $^{\circ}$ C)次之, 卵巢和精巢大小分别约为117.4 μ m \times 25.3 μ m和43.6 μ m \times 24.2 μ m; 低温组(16 $^{\circ}$ C)最慢, 性腺刚开始分化, 性腺大小出现明显的差别, 大的约为109.6 μ m \times 44.3 μ m, 小的约为43.2 μ m \times 23.7 μ m, 将来可能会发育为卵巢, 同时有一部分性腺仍呈原始性腺的形态, 大小差别不明显, 一般呈圆棒状, 将来可能发育为精巢, 大小约为61.7 μ m \times 12.5 μ m(图版 II)。根据组织学观察初步推测性腺分化的方向, 统计性别比例, 高温组、对照组和低温组的雌性率分别为70.0%、42.9%和33.3%。

50 dpb时, 对照组和低温组的许氏平鲈仔鱼平均全长分别为(29.2 \pm 0.7) mm和(25.2 \pm 0.6) mm。对照组(20 $^{\circ}$ C)卵巢和精巢发育快于低温组(16 $^{\circ}$ C), 对照组和低温组的卵巢均有微血管的深入和卵巢腔的出现, 但对照组卵巢体积明显较低温组的大, 卵巢腔的发育也较为完整, 对照组精巢呈梨形或椭圆形, 体积较大, 对照组的卵巢和精巢大小分别约为96.9 μ m \times 49.7 μ m和62.6 μ m \times 24.5 μ m; 低温组有一部分性腺仍呈原始性腺形态, 大小差别不明显, 一般为圆棒状, 将来可能发育为精巢, 卵巢和精巢大小分别约为82.6 μ m \times 19.7 μ m和42.8 μ m \times 9.8 μ m(图版 III)。根据组织学观察初步推测性腺分化的方向, 统计性别比例, 对照组和低温组的雌性率分别为50.0%和37.5%。在此时期观察到的性腺仍处于性腺分化时期, 卵巢还未发现细胞学分化的标志, 也没有发现精巢分化的显著标志, 温度对许氏平鲈性腺分化的影响仍有待进一步研究。

2.2 温度对全鱼组织匀浆中性类固醇激素含量的影响

许氏平鲈全鱼组织匀浆中 E_2 的标准曲线为lg-lg函数: $\lg(y) = 0.871 \times \lg(x) - 1.198$, $R^2 = 0.987$; T的标准曲线为Quadratic函数: $y = -0.009x^2 + 0.286x + 0.015$, $R^2 = 0.992$ 。

根据拟合函数计算出许氏平鲈全鱼组织匀



图版 I 不同温度下25 dpb时的许氏平鲷性腺

1. 高温(24 °C)下, 25 dpb的性腺; 2. 图1放大后的性腺; 3. 对照(20 °C)下, 25 dpb的性腺; 4. 低温(16 °C)下, 25 dpb的性腺。PG.原始性腺; PGC.原始生殖细胞; MD.中肾管, 下同。Bar=50 μm

Plate I Gonads of *S. schlegelii* at 25 dpb at different temperatures

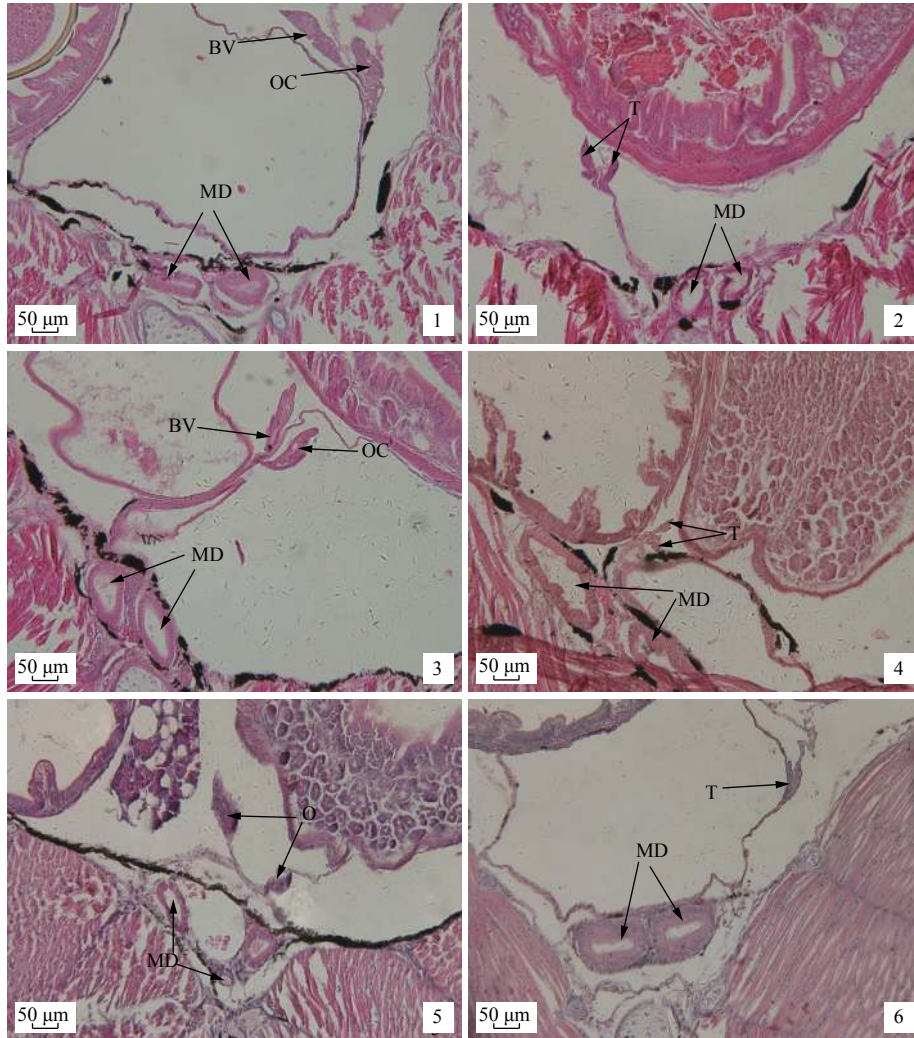
1. the gonads at 25 dpb at high temperature (24 °C); 2. the enlarged gonads of Fig. 1; 3. the gonads at 25 dpb at the control (20 °C); 4. the gonads at 25 dpb at low temperature (16 °C). PG. primordial gonad; PGC. primordial germ cell; MD. mesonephric ducts, the same below. Bar=50 μm

浆中 E_2 和T的含量, 在不同温度处理过程中, E_2 含量的总趋势均为先下降, 再趋于稳定。高温组的 E_2 水平从30~35 dpb急剧降低, 即从(36.85±4.8) ng/L到(5.89±0.47) ng/L ($P<0.05$); 对照组同样从30~35 dpb急剧降低, 即从(51.15±3.51) ng/L到(18.25±1.26) ng/L ($P<0.05$); 而低温组是从25~30 dpb急剧降低, 即从(80.82±8.36) ng/L到(22.28±4.87) ng/L ($P<0.05$)。从35~50 dpb, 高温组、对照组和低温组之间的 E_2 含量均无显著性变化($P>0.05$)(图1)。

高温组和低温组的T含量总体上均为先下降再趋于稳定, 而对照组的T含量变化趋势为先下降后上升, 再下降之后趋于稳定。高温组的T含量从25~35 dpb快速下降, 即从(12.06±2.3) nmol/L到(1.69±0.53) nmol/L ($P<0.05$); 对照组中T含量从30~35 dpb显著下降为(2.82±0.64) nmol/L, 40 dpb时显著上升为(5.83±1.07) nmol/L, 45 dpb时显著下降为(2.67±1.49) nmol/L, 之后趋于平稳; 低温组中T含量从25~35 dpb迅速下降, 即从(12.14±3.79) nmol/L下降到(5.16±1.59) nmol/L ($P<0.05$), 之后趋于平稳。45 dpb和50 dpb时, 对照组和低温组之间的T含量均无显著性变化($P>0.05$)(图2)。

2.3 温度对许氏平鲷性腺分化相关基因表达量的影响

高温组(24 °C)*cyp19a1a*的mRNA相对表达量呈先下降后上升再下降的趋势, 低温组(16 °C)和对照组(20 °C)均呈先下降后平稳的趋势, 35 dpb之后处于较低水平。24 °C下, 35和40 dpb时的*cyp19a1a* mRNA的表达量较对照组显著上调($P<0.05$), 16 °C下, 40~50 dpb *cyp19a1a* mRNA的表达量下调。*ERα*的mRNA相对表达量在25 dpb时为高温组>对照组>低温组, 除了40 dpb外, 其他时期均为低温组>对照组>高温组, 且低温组处于较高水平。16 °C下, 30~50 dpb时*ERα* mRNA的表达量较对照组显著上调($P<0.05$)。高温处理下, 在30和35 dpb时*ERβ2*的mRNA表达量较对照组有所上升, 40 dpb时高温组和对照组下降至极低水平, 低温处理下, 30 dpb时*ERβ2* mRNA的表达量快速下降, 之后处于极低水平, 30~50 dpb时mRNA的表达量显著下调($P<0.05$)。在高温24 °C下, *foxl2* mRNA的表达量在25 dpb时达到峰值; 20 °C下, *foxl2* mRNA的表达量在25~30 dpb达到最大值; 16 °C下, *foxl2* mRNA的表达量在30 dpb时达到峰



图版 II 不同温度下40 dpb时的许氏平鲈性腺

1. 高温(24 °C)下, 40 dpb的卵巢; 2. 高温(24 °C)下, 40 dpb的精巢; 3. 对照(20 °C)下, 40 dpb的卵巢; 4. 对照(20 °C)下, 40 dpb的精巢; 5. 低温(16 °C)下, 40 dpb的卵巢; 6. 低温(16 °C)下, 40 dpb的精巢。BV.血管; OC.卵巢腔; T.精巢; O.卵巢。Bar=50 μm, 下同

Plate II Gonads of *S. schlegelii* at 40 dpb at different temperatures

1. the ovarian at 40 dpb at high temperature (24 °C); 2. the testis at 40 dpb at high temperature (24 °C); 3. the ovarian at 40 dpb at the control (20 °C); 4. the testis at 40 dpb at the control (20 °C); 5. the ovarian at 40 dpb at low temperature (16 °C); 6. the testis at 40 dpb at low temperature (16 °C). BV. blood vessel; OC. ovarian cavity; T. testis; O. ovary. Bar=50 μm, the same below

值, 30~50 dpb时mRNA的表达量较对照组显著上调($P<0.05$)(图3)。

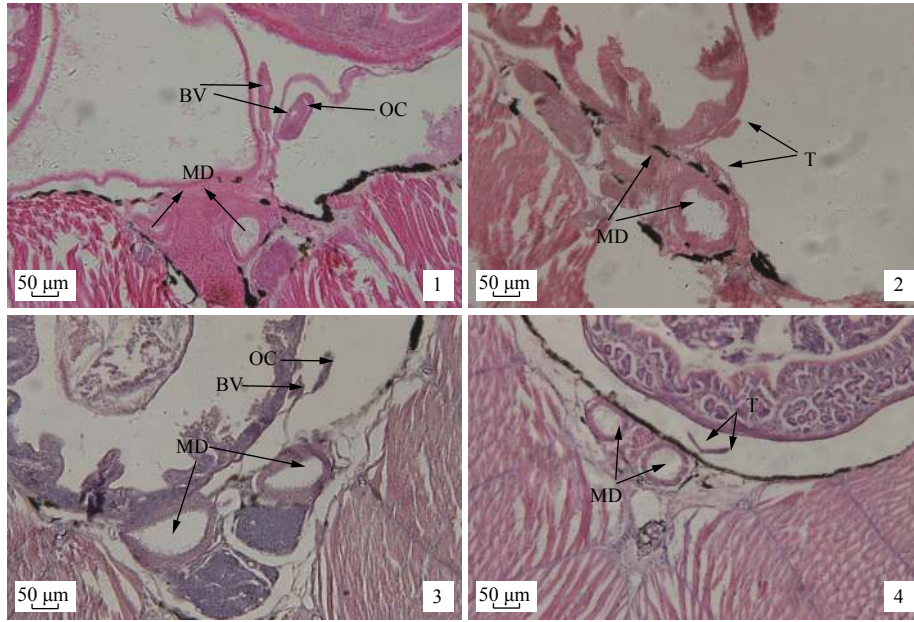
*sox3*的mRNA相对表达量总体呈逐渐下降的趋势, 40 dpb之后处于较低水平, 30 dpb时, 与对照组相比, 24 °C下的mRNA相对表达量显著上升($P<0.05$), 50 dpb时, 与对照组相比, 16 °C下的mRNA相对表达量显著下降($P<0.05$)。 *sox9*与 *sox3*的mRNA相对表达量变化趋势基本一致, 35 dpb之后基本处于较低水平, 在25、30、35 dpb时, 与对照组相比, 16 °C下的mRNA相对表达量均显著下降($P<0.05$)。 *amh*的mRNA相对表达量, 24 °C

和20 °C两组均呈先下降后上升的趋势, 16 °C时, 除了35 dpb外, 总体呈先上升后下降的趋势, 在30、40、45 dpb时, 与对照组相比, 16 °C下的mRNA相对表达量均显著上升($P<0.05$)。 *dmrt1*的mRNA相对表达量在30 dpb之后基本处于较低水平, 在45和50 dpb时, 与对照组相比, 16 °C下 *dmrt1*的mRNA相对表达量显著下降($P<0.05$)(图4)。

3 讨论

3.1 温度对许氏平鲈性腺分化的影响

温度是影响鱼类性腺分化的重要环境因素。



图版 III 不同温度下50 dpb时的许氏平鲉性腺

Plate III Gonads of *S. schlegelii* at 50 at different temperatures

据报道，大多数鱼类都是高温导致性腺偏雄性发育，低温偏雌性发育^[6]。在对黄颡鱼(*Pseudobagrus fulvidraco*)的研究中，(32±1) °C条件下(高温组)仔鱼性腺分化比(27±1) °C(中温组)早5~10 d，(22±1) °C(低温组)仔鱼发育缓慢，性腺分化比中温组晚25~30 d，高温组幼鱼雌雄比例为1 : 2.09，高温使性腺发育趋向雄性^[16]。本研究中，在24 °C下，

25 dpb时观察到性腺开始分化；20 °C下，30 dpb时性腺开始分化；16 °C下，40 dpb时性腺开始分化。说明在适宜温度范围内，温度越高许氏平鲉性腺发育越快。在40 dpb时，24 °C、20 °C和16 °C下的雌性率分别为70.0%、42.9%和33.3%，高温使许氏平鲉性腺偏雌性发育，低温使性腺偏雄性发育。本结果与Omoto等^[17]对许氏平鲉的研究结果相一致。在对鲫^[11]的研究中也出现类似的结果，(16±1) °C低温组的雌性率达40.8%，(30±1) °C高温组的雌性率最高，达到86%，其性腺分化趋向于偏雌性发育。初步推断，在许氏平鲉性腺分化期间，较高温度使性腺偏雌性发育，较低温度使性腺偏雄性发育。

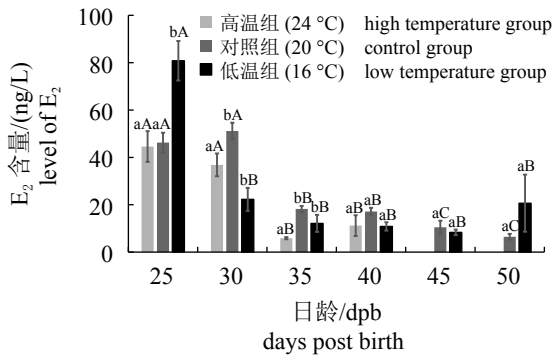


图 1 不同温度对许氏平鲉仔稚鱼E₂含量的影响

图中标注的小写字母表示同一时间点不同温度间存在显著性差异($P < 0.05$), 大写字母表示同一温度不同时间点间存在显著性差异($P < 0.05$), 下同

Fig. 1 Effects of the different temperature on the E₂ level of *S. schlegelii* larvae

Lowercase letters mean significant difference between different temperature at the same time ($P < 0.05$), capital letters means significant difference between different time at the same temperature ($P < 0.05$), the same below

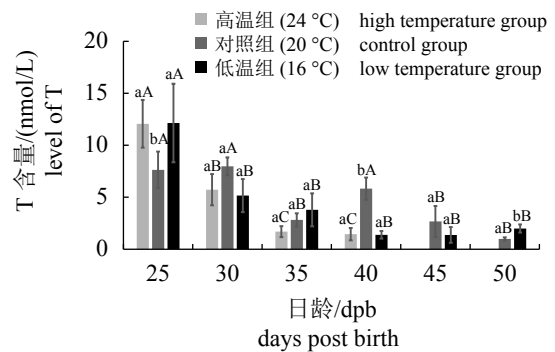


图 2 不同温度对许氏平鲉仔稚鱼T含量的影响

Fig. 2 Effects of different temperature on the T level of *S. schlegelii* larvae

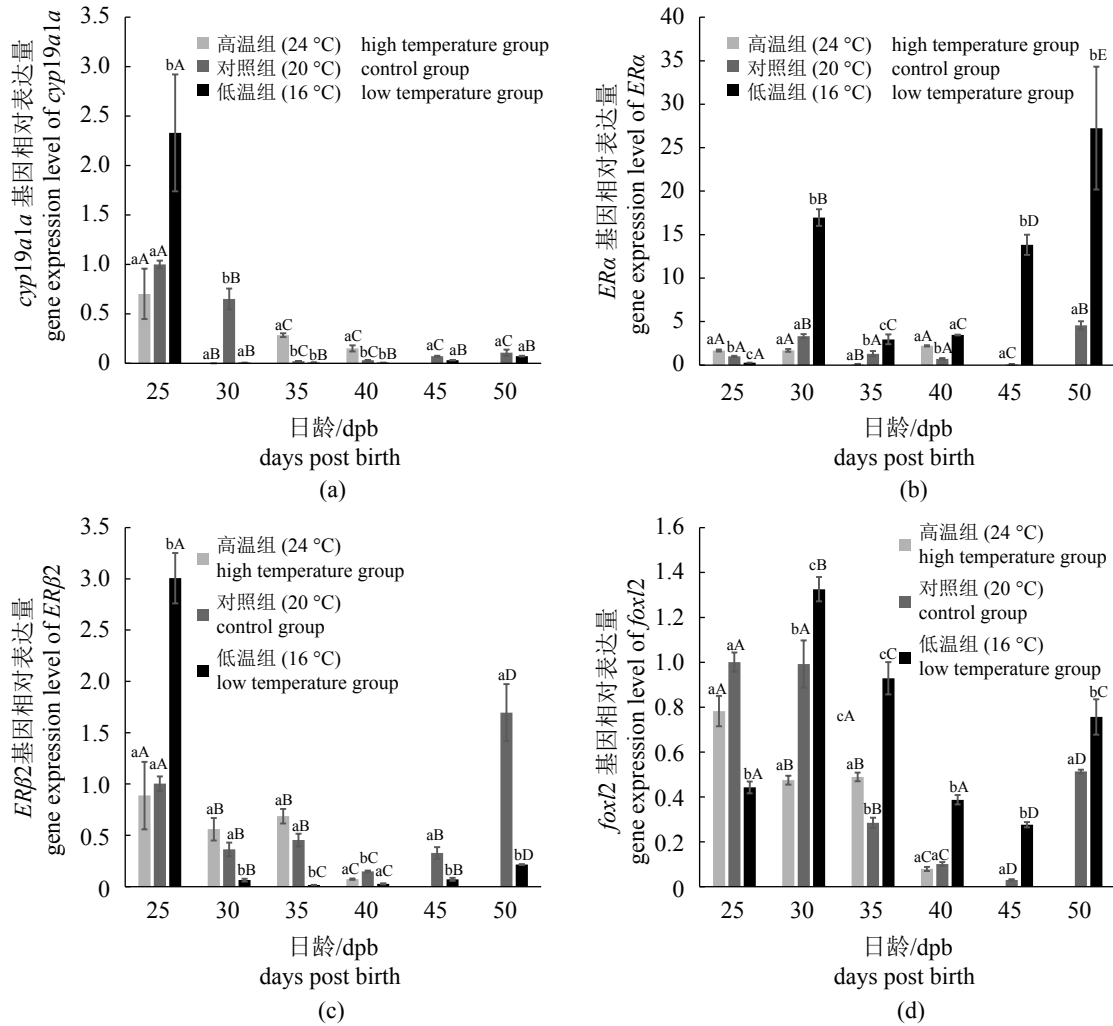


图 3 不同温度下许氏平鲈卵巢分化相关基因mRNA相对表达量

Fig. 3 mRNA relative expression level of ovary differentiation related genes in *S. schlegelii* at different temperature

3.2 温度对全鱼组织匀浆中性类固醇激素含量的影响

温度对鱼类的孵化、发育、繁殖和生存有着重要的影响，而幼鱼对温度的响应更为敏感。通常这种响应是通过内分泌系统进行的，尤其是抑制卵巢E₂的产生，而E₂是T经过芳香化酶催化合成的^[18]。Nakamura等^[19]的研究表明，内源性雌激素在卵巢分化时起重要作用，雄激素在精巢分化时起的作用并不大，但在精子发生中起重要作用，因此通过鱼体内性激素水平可以了解温度对幼鱼性腺分化的影响。

在对黄颡鱼的研究中，在(27±1) °C下，15日龄时开始性腺分化，(27±1) °C、(32±1) °C、(34±1) °C恒温组E₂水平在14日龄时均达到最大，E₂可

能和卵巢分化有关，14日龄(27±1) °C组的T水平显著低于其余各组，和卵巢分化有关。(22±1) °C组的精巢分化相对较晚，60日龄时T水平显著高于其他各温度组，T可能和精巢分化有关^[20]。在本研究中，高温组(24 °C)和对照组(20 °C)中的E₂在较高水平持续时间较长，性腺偏雌性发育，16 °C时的E₂水平迅速下降，可能是由于低温抑制了芳香化酶的活性，E₂含量减少，性腺偏雄性发育。另一方面，高温组和对照组的T水平从30~35 dpb急剧下降，而低温组在35 dpb时仍处于较高水平，也说明了低温使性腺偏雄性发育。可见性类固醇激素水平与组织切片中性腺分化基本一致，结合组织切片结果可知，较高温度下E₂含量较高，T含量相对较低，使性腺偏雌性发育；较低温度下T含量较高，E₂含量相对较低，

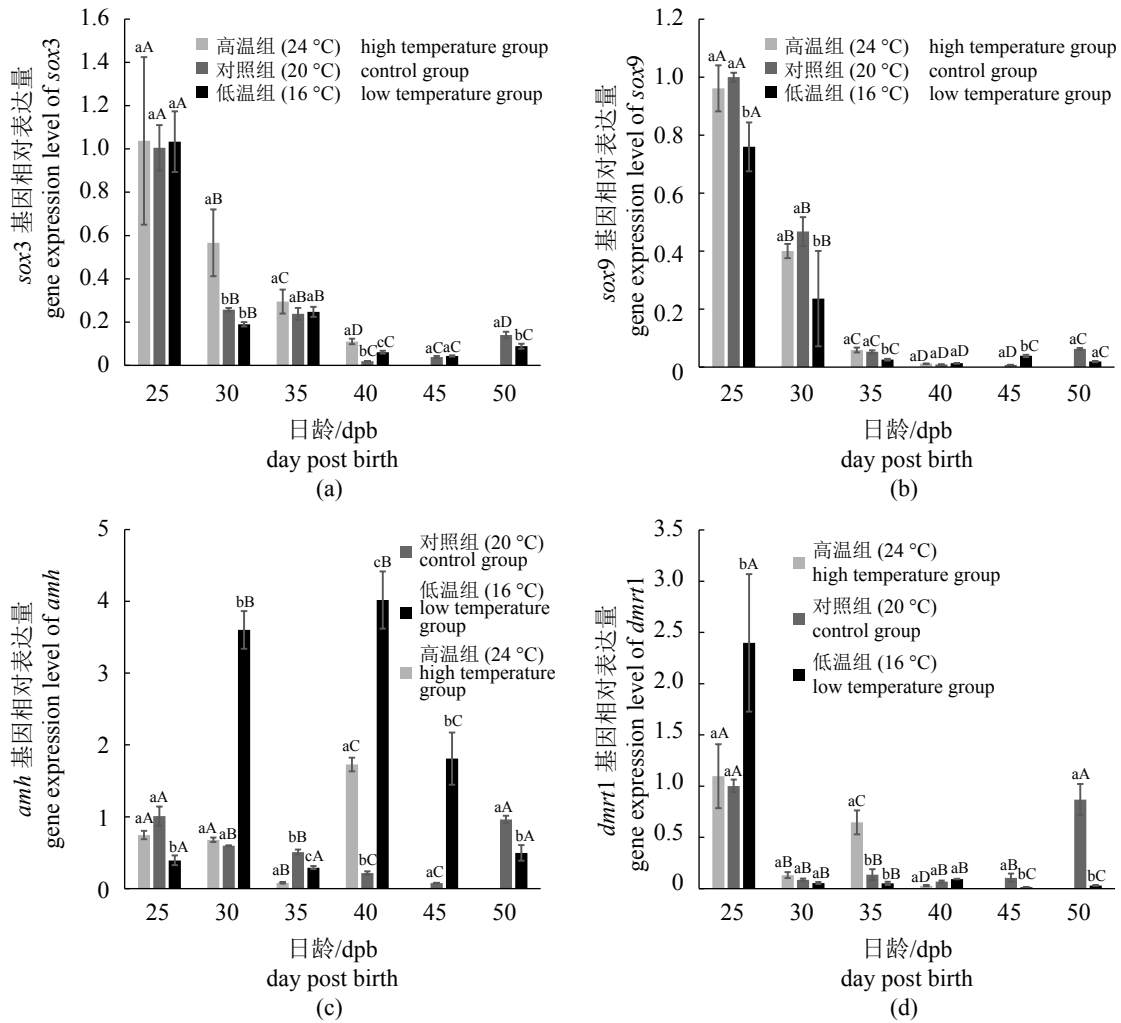


图 4 不同温度下许氏平鲈精巢分化相关基因mRNA相对表达量

Fig. 4 mRNA relative expression level of testis differentiation related genes in *S. schlegelii* at different temperature

使性腺偏雄性发育。性激素水平的变化也可能是由于温度对其他的类固醇合成酶有影响，从而影响了E₂和T合成。在不同的物种中，温度对性激素水平的影响不同，从而对鱼类性腺分化的影响也不同。另外，外源性激素对性腺分化也有着重要的影响，一般在雌激素的处理下偏雌性发育，雄激素处理下偏雄性发育，如舌齿鲈、许氏平鲈和斑马鱼(*Danio rerio*)等^[21-23]。进一步推断，在许氏平鲈性腺分化期间，较高温度使性腺偏雌性发育，较低温度使性腺偏雄性发育。

3.3 温度对许氏平鲈性腺分化相关基因表达量的影响

在鱼类性腺分化中，温度对其性腺分化的

快慢和方向有着重要的影响，其中性腺分化相关基因(*cyp19a1a*、*ERα*、*ERβ2*、*foxl2*、*sox3*、*sox9*、*amh*和*dmrt1*等)的表达也随之发生改变。对于大多数鱼类，性腺分化期间进行温度处理，在高温下偏雌性发育，与雄性分化相关的基因(如*amh*、*dmrt1*和*arb*等)表达量增加，与雌性分化相关的基因(如*cyp19a1a*、*esr1*、*esr2*、*erb1*、*fshr*和*foxl2*等)表达量降低^[6, 14]。*cyp19a1a*的表达与温度密切相关，有研究表明，在产生雄鱼的温度下*cyp19a1a*的表达被抑制，而在产生雌鱼的温度下促进*cyp19a1a*的表达^[24]。在舌齿鲈早期性别分化过程中，高温处理下，偏雌性发育，卵巢分化相关基因*cyp19a1a*的表达水平下降^[25]。同样，尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)在高温处理下偏雌性

发育, *cyp19a1a*启动子的DNA甲基化水平升高, 从而影响mRNA的表达水平, 促进雌性向雄性发育^[26]。在本研究中, 24 °C高温下, 35和40 dpb时的*cyp19a1a* mRNA的表达量显著上调, 16 °C低温下, 40~50 dpb *cyp19a1a* mRNA的表达量下调, 可能与高温导致性腺分化偏雌性发育有关。

在大多数鱼类中, 雌激素受体(estrogen receptor, ER)包含3种类型, 分别为ER α 、ER β 1和ER β 2, 参与鱼类的性别分化等生理过程^[27]。在鱼类性腺分化时期, 不同温度处理下, ER α 和ER β 2的表达随温度的变化而变化。在尼罗罗非鱼的研究中, 高温导致偏雄性发育, 高温组与对照组相比, ER α 的表达量下调^[28]。在甲状腺激素诱导斑马鱼雄性化的研究中, 性腺分化期间*cyp19a1a*、*esr1*、*esr2a*和*esr2b*的表达量下降^[29]。本研究中, 在低温下, 30~50 dpb时ER α mRNA的表达量显著上调, 表明ER α 基因可能不是高温诱导许氏平鲈雌性化的关键基因, 其作用仍有待进一步研究。另一方面, ER β 2在高温处理下, 30和35 dpb时mRNA的表达量上调, 但不显著, 而在低温下, 30~50 dpb时mRNA的表达量显著下调。初步推测, ER β 2的下调可能在性腺偏雌性发育中起着重要的作用。

有研究表明, *foxl2*是*cyp19a1a*的上游调节基因, 同样在性腺分化中起着非常重要的作用^[30]。在乌鳢(*Channa argus*)早期性腺分化中*foxl2*起着重要的作用, 1~11日龄表达水平显著上调, 27日龄时在卵巢中表达量升高^[31]。左炔诺孕酮可诱导斑马鱼雌性向雄性反转, *foxl2* mRNA的表达下调^[32]。本研究中, 24 °C高温下, *foxl2* mRNA的表达在25 dpb时达到峰值; 20 °C下, *foxl2* mRNA的表达在25~30 dpb达到最大值; 16 °C下, *foxl2* mRNA的表达在30 dpb时达到峰值。结合组织学观察, 初步推测, *foxl2*在许氏平鲈性腺分化早期的高表达可能与卵巢分化的速率有关。

*sox3*和*sox9*均属于*sox*基因家族, 与SYR基因序列有较高的相似性, 并在性腺分化中起着重要的作用。*dmrt1*基因是*dmrt*基因家族中的一员, 其DNA结合结构域为锌指样结构, 称为DM结构域, 该基因被认为是性别分化基因, 与雌雄性别发育有关^[14, 33]。这3个基因在鱼类性别分化中一般与精巢的分化有关。在黑鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)中, 与卵巢相比, 在精巢发育中*sox3*所发挥的作用更强^[34]。在高温诱导尼罗罗非鱼雄性

化中, *dmrt1*和*amh*在雄性中的表达量均上调^[35]。在不同鱼类中, *sox3*、*sox9*和*dmrt1*基因的表达模式有所差异, 同时, 对温度等环境因子的响应也不同。马丽曼^[36]对许氏平鲈*sox3*、*sox9*和*dmrt1*基因启动子进行了分析, 发现*sox9*蛋白结合位点在*sox3*、*sox9*和*dmrt1*基因的启动子区域, 认为*sox9*可能是*sox3*和*dmrt1*的上游调节基因, 同时在自身的调控中也起着一定的作用。在本研究中, *sox3*、*sox9*和*dmrt1*基因的表达水平变化总趋势基本一致, 也可能是由于*sox9*基因是*sox3*和*dmrt1*基因的上游调节基因, 调节*sox3*和*dmrt1*的转录表达。3组不同温度处理下, 在30~50 dpb, *sox3*、*sox9*和*dmrt1*的表达量均处于较低水平, 这可能与精巢的后分化有关。30 dpb时, 24 °C下*sox3* mRNA的表达量显著上调; 50 dpb时, 16 °C下*sox3* mRNA表达量显著下调; 在25~35 dpb时, 16 °C下*sox9* mRNA的表达量显著下调; 在45和50 dpb时, 16 °C下*dmrt1* mRNA的表达量显著下调。结合组织切片的观察, 初步推测, *sox3*、*sox9*和*dmrt1*基因可能与高温加快精巢分化的速率、低温延缓精巢分化的速率有关。

虽然在硬骨鱼类中没有缪勒氏管的存在, 但在其性腺中检测到了*amh*, 且具有性别二态性, 这说明*amh*可能在鱼类性腺分化和雄性性腺的维持中起到一定的作用^[37]。在舌齿鲈早期性别分化过程中, 高温处理下偏雄性发育, 精巢分化相关基因(*amh*和*dmrt*等)上调^[25]。在甲状腺激素诱导斑马鱼雄性化的研究中, 性腺分化期间*amh*的mRNA相对表达量也上调^[29]。在本研究中, 低温16 °C处理下, 30~45 dpb时*amh* mRNA表达量显著上调, 可能与低温导致许氏平鲈性腺分化偏雄性有关。

4 结论

在影响鱼类性腺分化的众多因素中, 目前研究较多的就是温度。在许氏平鲈性腺分化期间, 结合组织学观察、性类固醇激素水平和性腺分化相关基因的研究, 推测高温使许氏平鲈性腺偏雌性发育, 低温偏雄性发育。尽管本研究初步探索了温度对许氏平鲈性腺分化的影响及其潜在的机制, 但鱼类性腺分化与性别决定的机制极其复杂, 仍有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Yamamoto T. Sex differentiation[M]//Hoar W S, Randall D J. Fish physiology. New York: Academic Press, 1969: 117-175.
- [2] 宋卉, 王树迎. 鱼类原始生殖细胞的研究进展[J]. *动物医学进展*, 2004, 25(5): 22-23.
Song H, Wang S Y. Progress in fish primordial germ cells[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2004, 25(5): 22-23(in Chinese).
- [3] 彼尔索夫. 鱼类的性别分化[M]. 卢浩泉, 张天荫, 译. 北京: 农业出版社, 1982.
Перцов Г М. Sex Differentiation of fish[M]. Lu H Q, Zhang T Y, trans. Beijing: Agriculture Press, 1982(in Chinese).
- [4] Brown E E, Baumann H, Conover D O. Temperature and photoperiod effects on sex determination in a fish[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2014, 461: 39-43.
- [5] Baroiller J F, D'Cotta H. Environment and sex determination in farmed fish[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2001, 130(4): 399-409.
- [6] 王念民, 孙大江, 曲秋芝, 等. 温度对鱼类性别分化和性别决定的影响[J]. *水产学杂志*, 2007, 20(2): 91-93.
Wang N M, Sun D J, Qu Q Z, *et al.* Effects of temperature on the sex differentiation and determination of fishes[J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2007, 20(2): 91-93(in Chinese).
- [7] Sfakianakis D G, Papadakis I E, Papadaki M, *et al.* Influence of rearing temperature during early life on sex differentiation, haemal lordosis and subsequent growth during the whole production cycle in European sea bass *Dicentrarchus labrax*[J]. *Aquaculture*, 2013, 412-413: 179-185.
- [8] 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.
Chen Y H, Lin D J, You Y L. Gonad differentiation in loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) and the temperature effects[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2007, 14(1): 74-82(in Chinese).
- [9] Goto-Kazeto R, Abe Y, Masai K, *et al.* Temperature-dependent sex differentiation in goldfish: establishing the temperature-sensitive period and effect of constant and fluctuating water temperatures[J]. *Aquaculture*, 2006, 254(1-4): 617-624.
- [10] Patiño R, Davis K B, Schoore J E, *et al.* Sex differentiation of channel catfish gonads: normal development and effects of temperature[J]. *Journal of Experimental Zoology*, 1996, 276(3): 209-218.
- [11] 岳敏娟, 尤永隆, 林丹军. 温度对鲫鱼性腺分化的影响[J]. *动物学杂志*, 2009, 44(1): 9-16.
Yue M J, You Y L, Lin D J. The influence of temperature on sex differentiation of *Carassius auratus*[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2009, 44(1): 9-16(in Chinese).
- [12] Yamamoto E. Studies on sex-manipulation and production of cloned populations in hirame, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel)[J]. *Aquaculture*, 1999, 173(1/2/3/4): 235-246.
- [13] 邓思平, 陈松林, 田永胜, 等. 半滑舌鲷的性腺分化和温度对性别决定的影响[J]. *中国水产科学*, 2007, 14(5): 714-719.
- [14] Deng S P, Chen S L, Tian Y S, *et al.* Gonadal differentiation and effects of temperature on sex determination in half-smooth tongue-sole, *Cynoglossus semilaevis*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2007, 14(5): 714-719(in Chinese).
- [15] 刘畅, 苏利娜, 朱邦科. 鱼类性别决定及分化相关基因研究进展[J]. *湖北农业科学*, 2014, 53(13): 2981-2986.
Lu C, Su L N, Zhu B K. Advances on the genes related with sex determination and differentiation of fish[J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2014, 53(13): 2981-2986(in Chinese).
- [16] 文爱韵, 尤锋, 徐永立, 等. 鱼类性别决定与分化相关基因研究进展[J]. *海洋科学*, 2008, 32(1): 74-80.
Wen A Y, You F, Xu Y L, *et al.* Research progress on the study of sex determination and differentiation relateds to gene of fish[J]. *Marine Sciences*, 2008, 32(1): 74-80(in Chinese).
- [17] 游鑫, 邓闵, 刘全圣, 等. 黄颡鱼性腺分化及温度对性别分化的影响[J]. *华中农业大学学报*, 2016, 35(1): 106-113.
You X, Deng M, Liu Q S, *et al.* Gonadal differentiation and effects of temperature on sex determination in yellow catfish, *Pseudobagrus fulvidraco* Richardson[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2016, 35(1): 106-113(in Chinese).
- [17] Omoto N, Koya Y, Chin B, *et al.* Gonadal sex different-

- iation and effect of rearing temperature on sex ratio in black rockfish (*Sebastes schlegeli*)[J]. *Ichthyological Research*, 2010, 57(2): 133-138.
- [18] Pankhurst N W, Munday P L. Effects of climate change on fish reproduction and early life history stages[J]. *Marine and Freshwater Research*, 2011, 62(9): 1015-1026.
- [19] Nakamura M, Bhandari R K, Higa M. The role estrogens play in sex differentiation and sex changes of fish[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2003, 28(1/2/3/4): 113-117.
- [20] 游鑫. 温度对黄颡鱼性腺分化、性激素及早期生长的影响[D]. 武汉: 华中农业大学, 2015.
- You X. The effect of temperature on sex differentiation, sexsteroidhormones and growth in yellow catfish, *Pseudobagrus fulvidraco* Richardson[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2015(in Chinese).
- [21] Blázquez M, Felip A, Zanuy S, *et al.* Critical period of androgen-inducible sex differentiation in a teleost fish, the European sea bass[J]. *Journal of Fish Biology*, 2001, 58(2): 342-358.
- [22] Lee C H, Na O S, Yeo I K, *et al.* Effects of sex steroid hormones and high temperature on sex differentiation in black rockfish, *Sebastes schlegeli*[J]. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2000, 33(5): 373-377.
- [23] Luzio A, Monteiro S M, Garcia-Santos S, *et al.* Zebrafish sex differentiation and gonad development after exposure to 17 α -ethinylestradiol, fadrozole and their binary mixture: a stereological study[J]. *Aquatic Toxicology*, 2015, 166: 83-95.
- [24] Guiguen Y, Fostier A, Piferrer F, *et al.* Ovarian aromatase and estrogens: a pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 165(3): 352-366.
- [25] Díaz N, Piferrer F. Lasting effects of early exposure to temperature on the gonadal transcriptome at the time of sex differentiation in the European sea bass, a fish with mixed genetic and environmental sex determination[J]. *BMC Genomics*, 2015, 16(1): 679.
- [26] Wang Y Y, Sun L X, Zhu J J, *et al.* Epigenetic control of *cyp19a1a* expression is critical for high temperature induced Nile tilapia masculinization[J]. *Journal of Thermal Biology*, 2017, 69: 76-84.
- [27] 王厚鹏. 稀有鮡鲫ER基因的克隆及内分泌干扰物对其表达的影响[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2012.
- Wang H P. Molecular cloning of estrogen receptor genes and their expression upon endocrine disrupting chemicals exposure in rare minnow[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2012(in Chinese).
- [28] Li C G, Wang H, Chen H J, *et al.* Differential expression analysis of genes involved in high-temperature induced sex differentiation in Nile tilapia[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2014, 177-178: 36-45.
- [29] Sharma P, Tang S, Mayer G D, *et al.* Effects of thyroid endocrine manipulation on sex-related gene expression and population sex ratios in zebrafish[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2016, 235: 38-47.
- [30] Yoshiura Y, Senthilkumaran B, Watanabe M, *et al.* Synergistic expression of Ad4BP/SF-1 and cytochrome P-450 aromatase (ovarian type) in the ovary of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, during vitellogenesis suggests transcriptional interaction[J]. *Biology of Reproduction*, 2003, 68(5): 1545-1553.
- [31] Wang D D, Zhang G R, Wei K J, *et al.* Molecular identification and expression of the *Foxl2* gene during gonadal sex differentiation in northern snakehead *Channa argus*[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2015, 41(6): 1419-1433.
- [32] Hua J J, Han J, Guo Y Y, *et al.* The progestin levonorgestrel affects sex differentiation in zebrafish at environmentally relevant concentrations[J]. *Aquatic Toxicology*, 2015, 166: 1-9.
- [33] 田佳, 陈芸, 王艺磊, 等. 鱼类性别决定的影响因素[J]. *生命科学*, 2010, 22(10): 971-977.
- Tian J, Chen Y, Wang Y L, *et al.* Influencing factors of sex determination in fish[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2010, 22(10): 971-977(in Chinese).
- [34] Shin H S, An K W, Park M S, *et al.* Quantitative mRNA expression of *sox3* and DMRT1 during sex reversal, and expression profiles after GnRH α administration in black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2009, 154(1): 150-156.
- [35] Poonlaphdecha S, Pepey E, Canonne M, *et al.* Temperature induced-masculinisation in the Nile tilapia causes rapid up-regulation of both *dmrt1* and *amh* expressions[J]. *General and Comparative Endocrinology*,

- 2013, 193: 234-242.
- [36] 马丽曼. 许氏平鲈性别相关基因 *Sox3*、*Sox9* 和 *Dmrt1* 的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.
- Ma L M. Study on sex related genes *Sox3*, *Sox9* and *Dmrt1* in black rockfish, *Sebastes schlegelii*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014(in Chinese).
- [37] 闫浩, 梁利群, 常玉梅, 等. 遗传和温度因素对鱼类性别分化相关基因表达及性别比例的影响[J]. 大连海洋大学学报, 2017, 32(1): 111-118.
- Yan H, Liang L Q, Chang Y M, *et al.* Effects of inheritance and temperature on sex determination and differentiation related genes and sex ratio in fish: a review[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2017, 32(1): 111-118(in Chinese).

Effects of temperature on gonadal differentiation of black rockfish (*Sebastes schlegelii*) and its mechanism

ZHANG Simin, WANG Xiaojie, LI Jifang*, WEN Haishen, LÜ Likang

(Key Laboratory of Mariculture, Ocean University of China, Ministry of Education, Qingdao 266003, China)

Abstract: In this study, the black rockfish (*Sebastes schlegelii*) was selected as the research object. Three groups with different temperature treatments were set up, including high temperature group (24 °C), control group (20 °C) and low temperature group (16 °C). Histology, ELISA and qRT-PCR methods were used to investigate the effect of different temperatures on gonadal differentiation and the potential mechanism. The results showed that at 40 dpb, the gonads developed fastest at 24 °C, and slowest at 16 °C. The female ratio were 70.0%, 42.9% and 33.3%, at 24 °C, 20 °C and 16 °C respectively. At 24 °C and 20 °C, high level of E₂ lasted for a long time and T level decreased sharply at 30-35 dpb. At 16 °C, E₂ level dropped rapidly, and the T was still at a high level at 35 dpb. It indicated that at high temperature, the E₂ level was high, whereas T level was fairly low during gonad differentiation, and the gonad tended to be female; on the contrary, the gonad preferred to be male. At 24 °C, the *cyp19a1a* mRNA expression was significantly up-regulated at 35-40 dpb, which may be associated with the partial female gonad development at high temperature. At 16 °C, The *ERβ2* mRNA expression was significantly decreased at 30-50 dpb. The inhibition of *ERβ2* expression may be related to the partial male gonad development at low temperature. At 24 °C and 20 °C, *foxl2* mRNA expression was at relative high level at 25-35 dpb, and the expression level of low temperature treatment group began to increase at 30 dpb. It indicated that the high expression of *foxl2* may be related to the rate of ovarian differentiation during the early stage of gonadal differentiation. At 30-50 dpb, the general trend of expression levels of *sox3*, *sox9* and *dmrt1* was consistent, indicating there is a connection between the expressions of the three genes, which might be related to the rate of testis differentiation.

Key words: *Sebastes schlegelii*; temperature; gonadal differentiation

Corresponding author: LI Jifang. E-mail: lijf@ouc.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China(41676126)