

光周期对许氏平性腺分化过程中形态学、性激素水平及相关基因表达的影响

吕里康 张思敏 李吉方 温海深

EFFECTS OF PHOTOPERIOD ON MORPHOLOGY, SEX HORMONE LEVELS AND GENE EXPRESSION OF GONADAL DIFFERENTIATION OF BLACK ROCKFISH (*SEBASTES SCHLEGELII*)

L Li-Kang, ZHANG Si-Min, LI Ji-Fang, WEN Hai-Shen

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7541/2020.039>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

许氏平发育早期的氨基酸与脂肪酸组成及变化

ANALYSIS ON THE COMPOSITION OF AMINO ACID AND FATTY ACID AND THEIR CHANGES DURING EARLY GROWTH STAGE OF *SEBASTES SCHLEGELII*

水生生物学报. 2019, 43(3): 526–536 <https://doi.org/10.7541/2019.064>

中华鳖*Foxl2*基因克隆及外源性激素对其表达的影响

MOLECULAR CLONING AND EXPRESSION OF *FOXl2* GENE INDUCED BY EXOGENOUS HORMONE IN THE *PELODISCUS SINENSIS*

水生生物学报. 2019, 43(1): 45–51 <https://doi.org/10.7541/2019.006>

中华鲟促性腺激素释放激素受体基因cDNA序列的克隆及表达分析

CLONING AND EXPRESSION ANALYSIS OF GONADOTROPIN-RELEASING HORMONE RECEPTOR, *GNRH-R* IN CHINESE STURGEON (*ACIPENSER SINENSIS*)

水生生物学报. 2018, 42(1): 94–98 <https://doi.org/10.7541/2018.012>

不同蛋白源对瓦氏黄颡鱼幼鱼生长和蛋白质代谢相关基因表达的影响

EFFECTS OF DIFFERENT PROTEIN SOURCES ON GROWTH PERFORMANCE AND METABOLISM-RELATED GENE EXPRESSION IN JUVENILE DARKBARBEL CATFISH (*PELTEOBAGRUS VACHELLI*)

水生生物学报. 2019, 43(4): 693–700 <https://doi.org/10.7541/2019.082>

共轭亚油酸对草鱼肝脏和肌肉组织的细胞学形态、抗氧化能力以及脂肪代谢相关基因表达的影响

EFFECTS OF DIETARY CLA ON CYTOLOGICAL MORPHOLOGY, ACTIVITY OF ANTIOXIDANT ENZYMES, AND GENE EXPRESSIONS OF LIPID METABOLISM IN THE LIVER AND MUSCLE OF GRASS CARP

水生生物学报. 2019, 43(4): 708–722 <https://doi.org/10.7541/2019.084>

日光照周期对大菱鲆幼鱼摄食、消化酶活力与血清激素含量的影响

EFFECTS OF DAILY PHOTOPERIOD ON FEED CONSUMPTION, DIGESTIVE ENZYME ACTIVITIES AND BLOOD HORMONE OF TURBOT *SCOPHTHALMUS MAXIMUS* L. JUVENILES

水生生物学报. 2019, 43(1): 69–77 <https://doi.org/10.7541/2019.009>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

doi: 10.7541/2020.039

光周期对许氏平鲈性腺分化过程中形态学、性激素水平 及相关基因表达的影响

吕里康 张思敏 李吉方 温海深

(中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室, 青岛 266003)

摘要: 研究以35日龄(dpb)许氏平鲈(*Sebastes schlegelii*)仔稚鱼为对象, 研究不同光周期(短光照组L:D=8:16、长光照组L:D=16:8和对照组L:D=12:12)对性别分化、相关激素水平及基因表达水平的影响。结果显示非自然的光周期尤其是较短的光照, 会不同程度地影响性腺分化时期性腺发育程度, 并且短光照会导致部分性腺雄性化; 雌激素(E₂)在短光照组中更早出现峰值, 而雄激素(T)在3个处理组中均在实验第9天时达到峰值; 4个卵巢分化相关基因*cyp19a1a*、*ERα*、*ERβ2*和*foxl2*中, *ERα*、*ERβ2*和*foxl2*受短光照影响显著, 实验中后期出现明显的抑制($P<0.05$); 4个精巢发育相关基因*sox3*、*sox9*、*amh*和*dmrt1*相对表达水平未见明显规律, 可能与精巢分化时间较晚有关。综合而言, 较短的光照会影响性腺的发育以及性腺的分化, 抑制卵巢分化基因的表达, 诱导原始性腺雄性化。

关键词: 性腺分化; 光周期; 性激素; 基因表达; 许氏平鲈

中图分类号: S917.4

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2020)02-0319-11

鱼类性别决定与分化除了遗传型性别决定(Genetic Sex Determination, GSD)外, 还存在环境型性别决定(Environmental Sex Determination, ESD), 以及遗传+环境型性别决定^[1]。影响鱼类性别分化的环境因子主要包括温度、光周期、pH、盐度、种群密度等^[2]。温度是影响鱼类性腺分化的一种重要环境因素。除了温度外, 光周期也能够影响鱼类的性腺分化, 称为光周期依赖型性别决定(Photoperiod-dependent sex determination, PSD)。Brown等^[1]研究表明, 在加利福尼亚银汉鱼(*Leuresthes tenuis*)的性腺分化时期, 长光照(L:D=15:9)下性腺分化偏雌性发育, 短光照(L:D=12:12)下偏雄性发育。尽管光周期对鱼类的性腺分化有一定的影响, 但目前在光周期影响鱼类性腺分化这方面的报道较少, 大部分关注的是光周期对鱼类性腺发育和成熟, 比如: 月银汉鱼(*Menidia beryllina*)^[3]、金鱼(*Carassius auratus*)^[4]等。

鱼类性别决定和性腺分化相关基因的研究主要集中在*cyp19a*、*sox9*、*dmrt1*上, *ERα*、*ERβ2*等核

受体基因, 以及*foxl2*、*sox3*和*amh*等基因的相关报道也逐渐增多。例如在日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)的性腺分化时期*cyp19a1a*基因的表达量显著增加^[5]。在对金钱鱼(*Scatophagus argus*)的研究可见雌激素受体在精巢和卵巢发育中都具有重要的作用^[6]。同时鱼类的性别分化也与内分泌系统有着密切的联系。环境因素对鱼类性腺分化及发育的调控主要是各种性类固醇激素通过下丘脑-垂体-性腺轴实现的^[7], 这些性类固醇包括雌二醇(Estradiol, E₂)、睾酮(Testosterone, T)和11-酮基睾酮(Ketotestosterone, 11-KT)等。

许氏平鲈(*Sebastes schlegelii*)属硬骨鱼纲(Osteichthyes)、鲈形目(Scorpaeniformes)、鲈科(Scorpaenidae)、平鲈属(*Sebastes*), 俗称“黑头”、“黑石鲈”等, 是一种分布在西北太平洋近海岩礁底栖卵胎生硬骨鱼类。其肉质鲜美, 营养丰富, 生长快速且抗病能力强, 已成为我国北方沿海人工养殖的重要品种之一。其产仔期间正值4—6月, 昼夜时长变化剧烈, 发育阶段仔稚鱼会随着发育向水底下

收稿日期: 2018-06-04; 修订日期: 2019-05-14

基金项目: 国家自然科学基金(41676126)资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (41676126)]

作者简介: 吕里康(1992—), 男, 甘肃兰州人; 博士研究生; 研究方向为鱼类生理与繁育。E-mail: v8sy@live.com

通信作者: 温海深(1963—), 男, 教授; 研究方向为鱼类生理与繁育。E-mail: wenhaishen@ouc.edu.cn

沉。目前对许氏平鲈性腺分化相关研究较少,本实验室已对其性腺分化模式及温度影响下性腺分化情况展开了相关研究(未发表数据)。本研究在这一时期进行不同光周期处理实验,探究光周期对许氏平鲈性腺分化的影响。通过组织学切片技术观察许氏平鲈仔鱼性腺分化与发育情况,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,探究不同光周期对性腺分化影响中的潜在机制。同时为光周期对卵胎生鱼类性腺分化的影响提供一定的资料和依据,并对许氏平鲈养殖生产提供一定的指导。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼

实验所用仔稚鱼于2016年5月采至山东省青岛市贝宝有限责任公司养殖群体,养殖环境水温14—19℃,盐度(29±1)‰。在自然条件下养殖,30 dpb (day post birth)后挑选体质健康,发育良好的仔稚鱼[体长(1.190±0.028) cm, 体质量(0.032±0.001) g]转至实验室循环水养殖系统养殖,共布3个玻璃缸(40 cm×40 cm×40 cm),水温19—22℃,盐度30‰,养殖密度为2尾/L。

1.2 实验设计及样品采集

从30 dpb时开始,暂养4d,35 dpb开始正式实验。设置3组,分别为:短光照组(L:D=8:16,光照时间为7:00—15:00)、长光照组(L:D=16:8,光照时间为7:00—23:00)和对照组(L:D=12:12,光照时间为7:00—19:00),因在室内循环水养殖系统中进行实验,所有光照条件均为8.5 W节能灯补充,其他条件不变。每日8:00和15:00投喂卤虫无节幼体,实验第10天添加配合饲料。

根据本实验室未发布研究结果显示,卵巢在35 dpb左右开始出现分化,精巢分化时间较晚,在60—65 dpb左右,70 dpb出现明显的精原细胞和输精管,故本实验从35 dpb为开始实验的第1天,实验到第21天为止。从1d起,每3天采1次样,随机取2—3尾许氏平鲈仔稚鱼样品于Bouin固定液中保存;取8尾许氏平鲈仔稚鱼样品在液氮中快速冷冻,于-80℃保存备用。

1.3 石蜡组织切片及观察

许氏平鲈仔稚鱼全鱼经过Bouin固定液固定24h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,全鱼连续纵切,切片厚度为7 μm,展片,38℃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。在显微镜下观察拍照,并统计性别比例。

1.4 许氏平鲈仔稚鱼雌二醇(E₂)和睾酮(T)含量的测定

因稚鱼规格太小,无法抽取血液,故使用未去除内脏团的全鱼组织匀浆进行激素测定。每1尾鱼为一个样本,1个时期3个生物学重复,共3尾鱼。制备全鱼组织匀浆,采用碘¹²⁵雌二醇放射免疫分析试剂盒(九鼎,天津)及RIA液相平衡竞争放射性免疫分析法测定E₂和T的水平,参考Shi等^[8]的方法。

1.5 许氏平鲈仔稚鱼性别分化相关基因表达分析

运用Trizol法按照相应的步骤提取全鱼总RNA,每个时期3尾,使用PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser(Perfect Real Time)试剂盒(TaKaRa, 日本)去除基因组DNA并反转录成cDNA。*cyp19a1a*(FJ594995.2)、*ERβ2*(HQ452829.1)、*foxl2*(JN998083.1)和*βactin*(KF430616.1)基因序列来源于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(登录号: SRR4409372)。实验中所用的特异性引物用Primer Premier 5.0软件设计(表1)。

采用SYBR[®] Premix Ex TaqTM (Tli RNaseH Plus)试剂盒(TaKaRa, 日本)在StepOnePlusTM Real-Time PCR系统(Applied Biosystems, 美国)上进行实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测性腺分化相关基因表达量,每个时期5尾鱼的cDNA(500 ng/μL)等体积混为一个样本。实验的反应体系及上机程序见本实验室已发表文章^[9]。以 β -actin为内参基因,根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算得到许氏平鲈性腺分化相关基因mRNA的相对表达量。

1.6 数据处理

使用SPSS19.0统计软件进行单因素方差分析(ANOVA),探究许氏平鲈稚鱼不同发育阶段以及不同光周期下各数据的差异显著性,在假定方差齐性的条件下,作Tukey-HSD多重比较分析(若不满足方差齐性,采用Games-Howell法)。所得数据均用平均值±标准误(Mean ± SE)表示。

2 结果

2.1 不同光周期对许氏平鲈性腺发育及分化的影响

根据本研究室前期研究结果,35 dpb左右稚鱼性腺开始分化,并且卵巢先分化。一部分性腺出现小的裂隙,可能发育为卵巢腔,性腺双叶大小差别明显,这类性腺一般发育为卵巢;另外一部分性腺双叶大小差别不明显,性腺中无裂隙出现,这类性腺一般发育为精巢(未发表数据)。

处理第0天,许氏平鲈性腺分化已开始,根据对全鱼组织学切片分析(图1),卵巢发育程度为长光

照组发育最快, 短光照组最慢。该时期卵巢中有血管的深入和卵巢腔的出现, 在短光照组中, 卵巢体积较小, 卵巢腔的裂隙较小, 而对照组与长光照组卵巢腔裂隙较大, 微血管明显, 卵巢体积相对较大, 其中长光照组卵巢体积最大。而2个处理组中精巢均呈梨形或椭圆形, 性腺双叶大小差别不明显, 精巢发育程度差别不明显。统计性别比例结果为短光照组、对照组和长光照组的雌雄比均为1:1。

处理21d后(图2), 卵巢的发育程度为对照组最快, 短光照组发育最慢, 对照组中卵巢体积最大, 卵巢腔发育较为完整, 并可见数个卵母细胞; 短光照组和长光照组的卵巢腔裂隙较小, 卵巢体积最小。精巢的发育程度为对照组和短光照组大于长光照组, 对照组精巢中出现输精管, 短光照组精巢中可观察到数个精原细胞, 精巢分化开始, 对照组和短光照组中的精巢体积均较长光照组中的大, 长光照组中未出现输精管或精原细胞的出现, 体积较小, 呈梨形(图2)。统计性别比例结果为: 短光照组和长光照组雌雄比无变化, 均为1:1, 对照组雌性率升高, 达到66.7%, 说明光周期为L:D=12:12时, 性腺分化偏雌性发育。

综合分析性腺发育程度和性别比例, 可以看出非自然光周期(短光照和长光照)均会影响性腺分化, 可能导致了性腺发育速度减慢, 同时通过对长光照和短光照射品组织学比较发现在性腺发育受影响的情况下, 短光照中精巢发育较长光照快, 说明短光照可能会导致部分性腺雄性化。

2.2 不同光周期对许氏平鲈性类固醇激素水平的影响

如图3A所示, 在对照组中, 实验0—6d无显著性变化, 9d时, E_2 水平显著上升至最大值($P<0.05$), 12d时 E_2 水平显著下降($P<0.05$), 之后趋于平稳; 在短光照组中, 实验第3天 E_2 水平显著上升($P<0.05$), 3—15d E_2 水平基本处于较高水平, 18d后显著下降

为($P<0.05$), 之后趋于平稳; 长光照组处理0—3d无显著性变化, 6d时, E_2 水平显著上升($P<0.05$)后开始下降, 至12d时 E_2 水平显著下降($P<0.05$), 之后趋于平稳。可见在实验整个阶段中, E_2 水平波动基本出现在0—18d。并且在短光照中, E_2 水平更早出现峰值。

如图3B所示, 对照组0—6d时, T的含量处于较低水平, 9d时, T水平显著上升至最大值($P<0.05$), 12d时T水平显著下降($P<0.05$), 之后趋于平稳; 短光照组0—6d, T水平逐渐降低($P<0.05$), 到第9天开始上升并维持至15d之间, T水平基本处于较高水平, 至18d的T水平显著下降($P<0.05$), 之后趋于平稳; 长光照组第3天T水平显著下降, 第6天时显著上升至最大值($P<0.05$), 并在12d之前含量一直维持在较高水平, 第15天时开始显著下降($P<0.05$), 之后趋于平稳。在整个实验周期中, T水平在3个处理中均在9d时达到峰值, 到18—21d, 各组之间趋于稳定。

2.3 光周期对许氏平鲈性腺分化相关基因表达水平的影响

如图4所示, *cyp19a1a*在短光照组第1天时开始显著下降($P<0.05$), 第9天时进一步显著下降($P<0.05$), 之后水平基本保持不变; 对照组中从第6天逐渐下降至接近0, 之后处于极低水平, 21d时有所上升, 但仍处于较低水平; 长光照组9d之后处于极低水平, 21d时有所上升, 但仍处于较低水平。可见*cyp19a1a*在实验第6天均出现下降趋势, 并在后期处于较低的稳定期, 不同处理之间无明显差异。*ERα*的相对表达水平在短光照组的波动类似*cyp19a1a*, 呈波动下降趋势, 从第3天开始下降, 在15d时出现一个较小的峰值, 然后趋于稳定; 对照组和长光照组均呈先上升后下降的趋势, 对照组中1—12d逐渐上升至峰值后逐渐下降, 长光照中1—9d逐渐上升峰值后有所下降, 但整体处于较高水平。可见在3个处理组中, 短光照组的*ERα*在中后

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>	F: ACCTGGACAGTTTGGCTCA	R: GAGGCAGTCCAAGGTAAGG
<i>ERβ2</i>	F: GCCACGGACCTCTAACCT	R: GACTTCCTCCTCTGACCTCTT
<i>foxl2</i>	F: CAAGAAAGGTTGGCAGAA	R: GTAGGACATCGGAGTGGG
<i>ERα</i>	F: CCTGACGCAGAGCAAGCA	R: GAGTCCAGAGGAGCAGAGTA
<i>sox9</i>	F: AGAGGCTCCTTCCATCCG	R: AGCACGCCAGACTCAGAC
<i>amh</i>	F: AGCCTCACCGTGTCCCTA	R: TCCCGTGTTCGTTCAAGTC
<i>sox3</i>	F: CTGCTGCGTGGTGGTGTA	R: CCTCATCAGCACCATAGCA
<i>dmrt1</i>	F: TGGAGGCTATCATCACGG	R: CAGGCAACTCTTCATTCTTA
<i>β-actin</i>	F: TGGAGGCTATCATCACGG	R: CAGGCAACTCTTCATTCTTA

期表达受到了明显的抑制。*ERβ2*的相对表达水平在短光照组第6天时显著上升但在9d时迅速显著下降($P<0.05$),之后均处于极低水平,21d时有所上升;对照组和长光照组均呈稳定下降的趋势,并在9d后趋近于0。类似于*ERα*,短光照组对*ERβ2*表达模式有同样的影响。*foxl2*的相对表达水平在短光照组6d时显著上升并在9d时显著下降至极低水平,之后有轻微上升趋势;对照组和长光照组均呈先下降后趋于平稳再上升的趋势。在对照组中第6天后逐渐下降并在之后处于极低水平,21d时有所上升;而在长光照组中第9天逐渐下降并在之后处于极低水平,21d时有所上升。由此可见相对短光照处理,长光照处理对*foxl2*的表达未见影响。

如图5所示,*sox3*的相对表达水平在短光照组

3—6d显著上升至最大然后在第9天时开始下降,18d时显著上升至较高水平($P<0.05$)然后在21d时开始下降;对照组处理阶段在21d之前*sox3*均处于较低水平,21d时显著上升($P<0.05$);在长光照组中第6天和18d处于较高水平,其他时期均处于较低水平。*sox9*的相对表达水平在短光照组1—6d逐渐上升但在第9天显著下降至较低水平($P<0.05$),第21天逐渐上升;对照组在1—6d逐渐下降后趋于稳定,21d时显著上升($P<0.05$);长光照组在6d后逐渐下降后保持在较低水平。*sox9*的表达模式在长光照组中并未受影响,但在短光照处理下出现不同的表达模式,尤其是在6d前显著上升。*amh*的表达水平在短光照组中从第3天时显著下降($P<0.05$),之后保持在较低水平;对照组在1—6d逐渐下降之后基本不

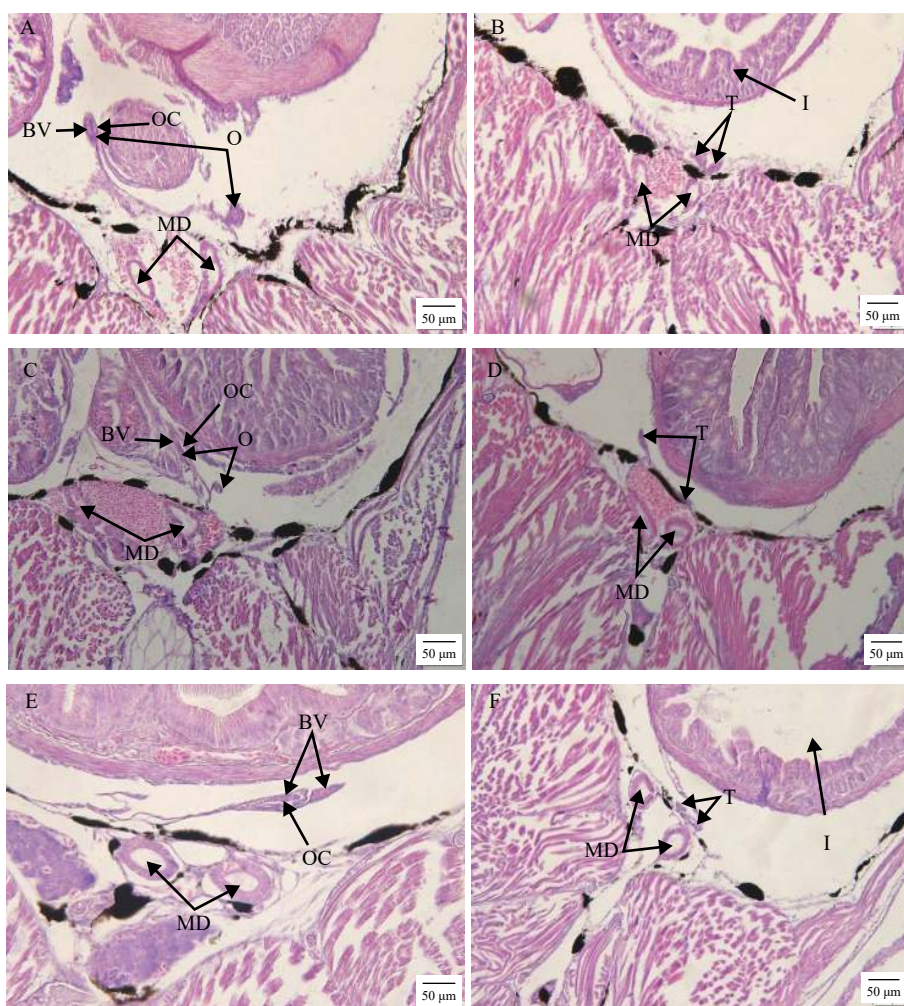


图1 不同光周期下第0天许氏平鲈的性腺组织切片

Fig. 1 The gonads histologic section of *Sebastes schlegelii* at day 0 under the different photoperiod conditions

A. 短光照(L:D=8:16)组卵巢; B. 短光照组精巢; C. 对照(L:D=12:12)组卵巢; D. 对照组精巢; E. 长光照(L:D=16:8)组卵巢; F. 长光照组精巢; 比例尺=50 μm; MD. 中肾管; BV. 血管; OC. 卵巢腔; O. 卵巢; T. 精巢; I. 肠

A. Ovarian under the short light photoperiod; B. Testis under the short light photoperiod; C. Ovarian under the control condition; D. Testis under the control condition; E. Ovarian under the long light photoperiod; F. Testis under the long light photoperiod. Scale=50 μm. MD. mesonephric ducts; BV. blood vessel; OC. ovarian cavity; O. ovarian; T. testis; I. intestines

变,但在18d时显著上升($P<0.05$);长光照组总体呈上升趋势,21d上升至最大值。不同的光照对 amh 的表达模式影响显著,短光照抑制其表达,长光照则相反。 $dmrt1$ 的表达水平在短光照组中除了第6d外,其他时期均处于较低水平;对照组中15d之前基本处于较低水平,15d时显著上升($P<0.05$),之后逐渐下降;长光照组中除了第6和第15天外,其他时期均处于较低水平,其中15d时达到最大值。

3 讨论

3.1 光周期对许氏平鲈性腺分化的影响

鱼类生殖受多种因素影响,在中高纬度季节变化中,光周期对其影响尤其大^[10]。本实验室未发表结果显示,本实验开始时(30 dpb)性腺已开始分

化。本实验处理21d时,对照组的卵巢发育速度最快,其次是长光照组,短光照组最慢,对照组和短光照组精巢的发育速度差异不明显,但快于长光照组,短光照组和长光照组雌雄比无变化,对照组雌雄比升高,光周期为L:D=12:12时,性腺分化偏雌性发育。综合分析本实验结果性腺发育程度和性别比例,可以看出非自然的光周期尤其是较短的光照,均会不同程度地影响性腺分化时期性腺发育程度;并且短光照会导致部分性腺雄性化。在加利福尼亚银汉鱼的性腺分化时期,长光照(L:D=15:9)处理下性腺分化偏雌性发育,短光照(L:D=12:12)处理下偏雄性发育^[1],这与本研究的结果有所不同。从性腺发育速度来看,在本研究中卵巢与精巢对光周期的响应相反,对照组中卵巢和精巢发育均较快。

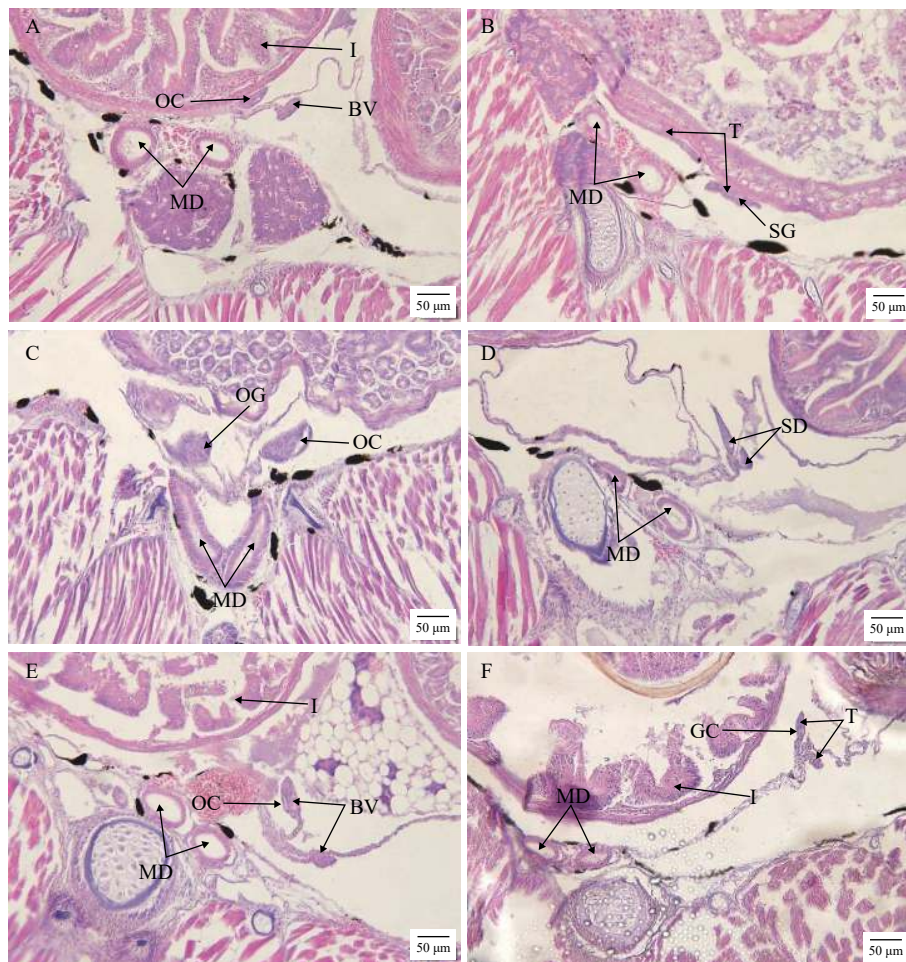


图2 不同光周期下第21天许氏平鲈的性腺组织切片

Fig. 2 The gonads histologic section of *Sebastes schlegelii* at day 21 under the different photoperiod conditions

A. 短光照组卵巢; B. 短光照组精巢; C. 对照组卵巢; D. 对照组精巢; E. 长光照组卵巢; F. 长光照组精巢; 比例尺=50 μ m; MD. 中肾管; BV. 血管; SG. 精原细胞; OC. 卵巢腔; OG. 卵原细胞; O. 卵巢; SD. 输精管; T. 精巢; I. 肠; GC. 生殖细胞

A. Ovarian under the short light photoperiod; B. Testis under the short light photoperiod; C. Ovarian under the control condition; D. Testis under the control condition; E. Ovarian under the long light photoperiod; F. Testis under the long light photoperiod. Scale=50 μ m. MD. mesonephric ducts; BV. blood vessel; SG. spermatogonia; OC. ovarian cavity; OG. Oogonia; O. ovarian; SD. sperm ductus; T. testis; I. intestines; GC. germ cell

在松江鲈(*Trachidermis fasciatus*)^[11]生长和性腺发育的关键时期,长光照14h较自然光照周期有利于促进松江鲈的性腺发育,长光照组的卵巢较自然光对照组发育更快。月银汉鱼^[3]、金鱼^[4]等性腺发育研究表明,光照时间越长发育成熟速度越快,但对大西洋鲑(*Salmo salar*)的研究结果相反^[12]。因此,这说明在同一光照周期下,不同物种的性腺分化和发育速度对光照周期的应答和敏感程度不同。

3.2 光周期对许氏平鲈全鱼性类固醇激素水平的影响

光照周期在硬骨鱼类性腺分化、发育和成熟等过程中起着重要的作用,主要是各种性激素通过下丘脑-垂体-性腺轴实现调控的^[7],其中包括E₂、T、11-KT等。Frisch^[13]的研究表明,E₂和11-KT在鱼类性别改变中也起着重要的作用,而T不能直接影响性别的改变,但是可以间接地通过影响其他激素(如E₂)的合成来影响性别改变。在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)和尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)性腺分化中,尤其是卵巢分化中,雌激素的合成

起着重要的作用^[14]。在本研究中,在3组不同光周期处理下第9天时,E₂和T均达到较高水平,12d时对照组E₂和T水平下降到较低水平,而长光照组E₂和T水平下降到较低水平是在12d和15d,短光照组E₂和T在18d时才下降到较低水平。结合组织切片结果可知,性腺分化过程中的前期E₂和T处于较高水平,之后下降到较低水平。因此,对照组卵巢发育最快,短光照组的精巢发育较快,可能是由于T的含量处于较高水平时间较长所导致。综合来说,光周期为L:D=12:12时有利于许氏平鲈的性腺分化,但不同的物种E₂和T对光周期的应答不同,比如对半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)^[15]的研究中光周期对T和E₂的影响不显著;在对虹鳟^[16]的研究中,增加光照周期,E₂和T含量增高,在短光照下,2种激素含量上升更快,证明短光照刺激使E₂和T含量升高,短光照对虹鳟性腺成熟发育非常重要。

3.3 光周期对许氏平鲈性腺分化相关基因表达水平的影响

目前,大多数对硬骨鱼类性别分化相关基因的

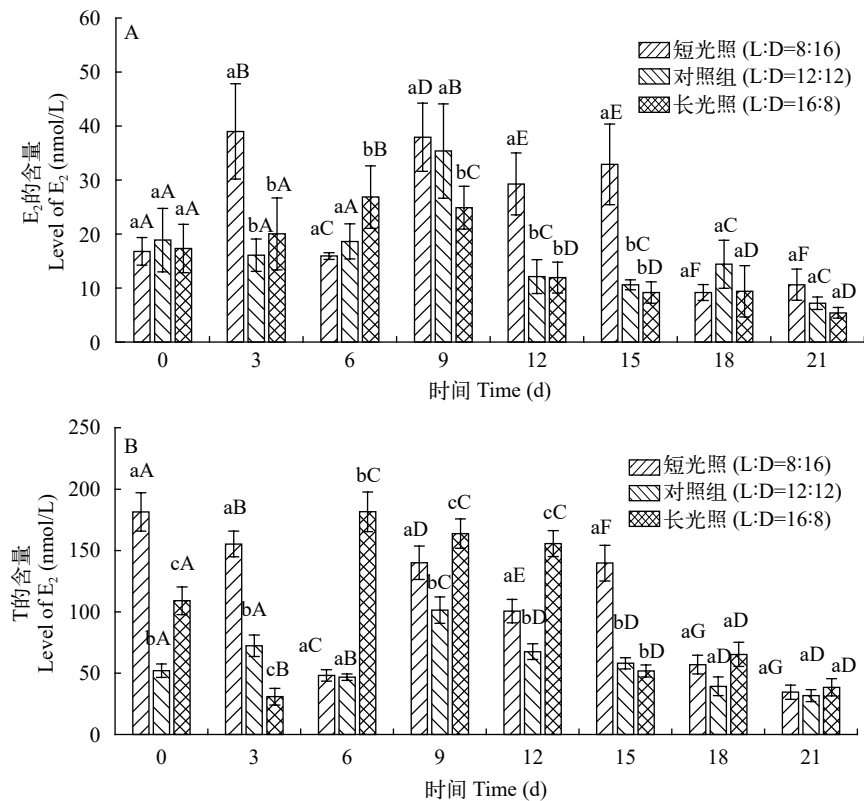


图3 不同光周期对许氏平鲈仔稚鱼E₂(A)、T(B)水平的影响

Fig. 3 Effects of the E₂ (A) and T (B) level of *Sebastes schlegelii* larvae under different photoperiod condition

图中标注的小写字母表示同一时间点不同光周期期间存在显著性差异($P<0.05$),大写字母表示同一光周期不同时间点间存在显著性差异($P<0.05$);下同

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

研究表明, 与性腺分化相关的基因主要有 *dmrt* 基因家族、*cyp11a1* 基因、*sox* 基因家族、核受体基因 (雌激素受体和雄激素受体)、*amh* 基因和 *foxl2* 基因等^[17]。其中 *cyp19a1a*、*ERα*、*ERβ2* 和 *foxl2* 基因与卵巢的分化密切相关, 在卵巢分化中起着重要的调

控作用; 而 *sox3*、*sox9*、*amh* 和 *dmrt1* 基因与精巢的分化相关, 但 *sox3* 基因在一些鱼类的卵巢分化也起着一定的作用^[18]。外界环境通过这些基因来调控性腺分化和发育等过程。

cyp19a1a 是介导雄激素向雌激素转化的关键

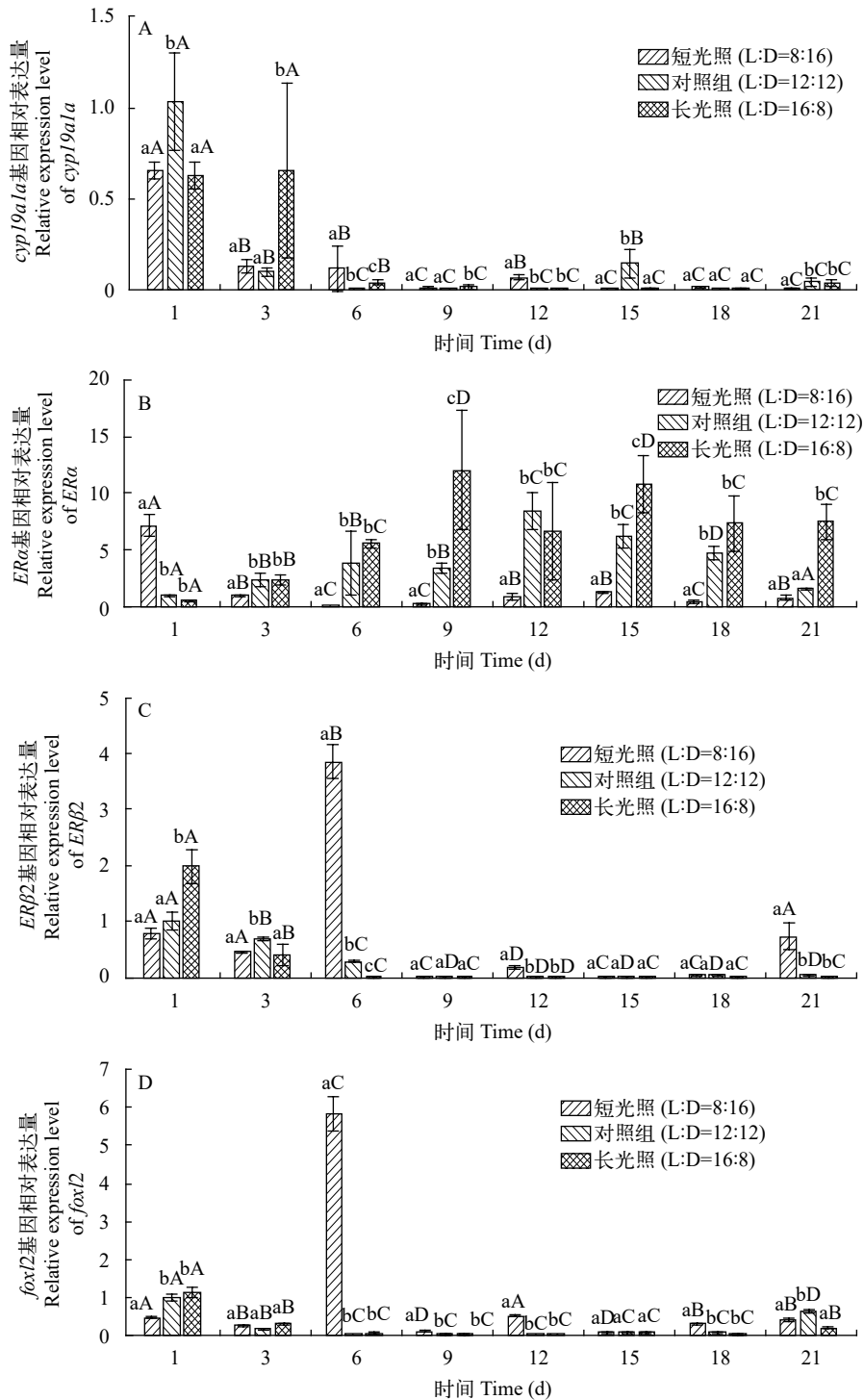


图 4 不同光周期下许氏平鲈卵巢分化相关基因 mRNA 相对表达水平 (A、B、C 和 D 分别为 *cyp19a1a*、*ERα*、*ERβ2* 和 *foxl2* mRNA 相对表达水平)

Fig. 4 The relative mRNA expression level of ovary differentiation related genes in *Sebastes schlegelii* under different photoperiod condition (A, B, C and D showed the relative mRNA expression level of *cyp19a1a*, *ERα*, *ERβ2* and *foxl2*, respectively)

酶基因,被认为是一个鱼类卵巢分化的早期标志,并且在性腺分化过程中有重要作用^[19]。研究表明,*cyp19a1a*基因只在卵巢中表达,在精巢中基本上没有表达,并且其表达水平及活性与雌激素的合成紧密相连^[18]。在暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*)^[20]性

腺分化期间用芳香化酶抑制剂处理仔鱼,雌鱼*cyp19a*基因表达被显著抑制,原始卵巢退化,并向功能性精巢发育。在本研究中,实验第1天(35 dpb)时性腺已开始分化,在3组实验中*cyp19a1a*的表达量均逐渐下降,之后稳定在较低水平。在开始时

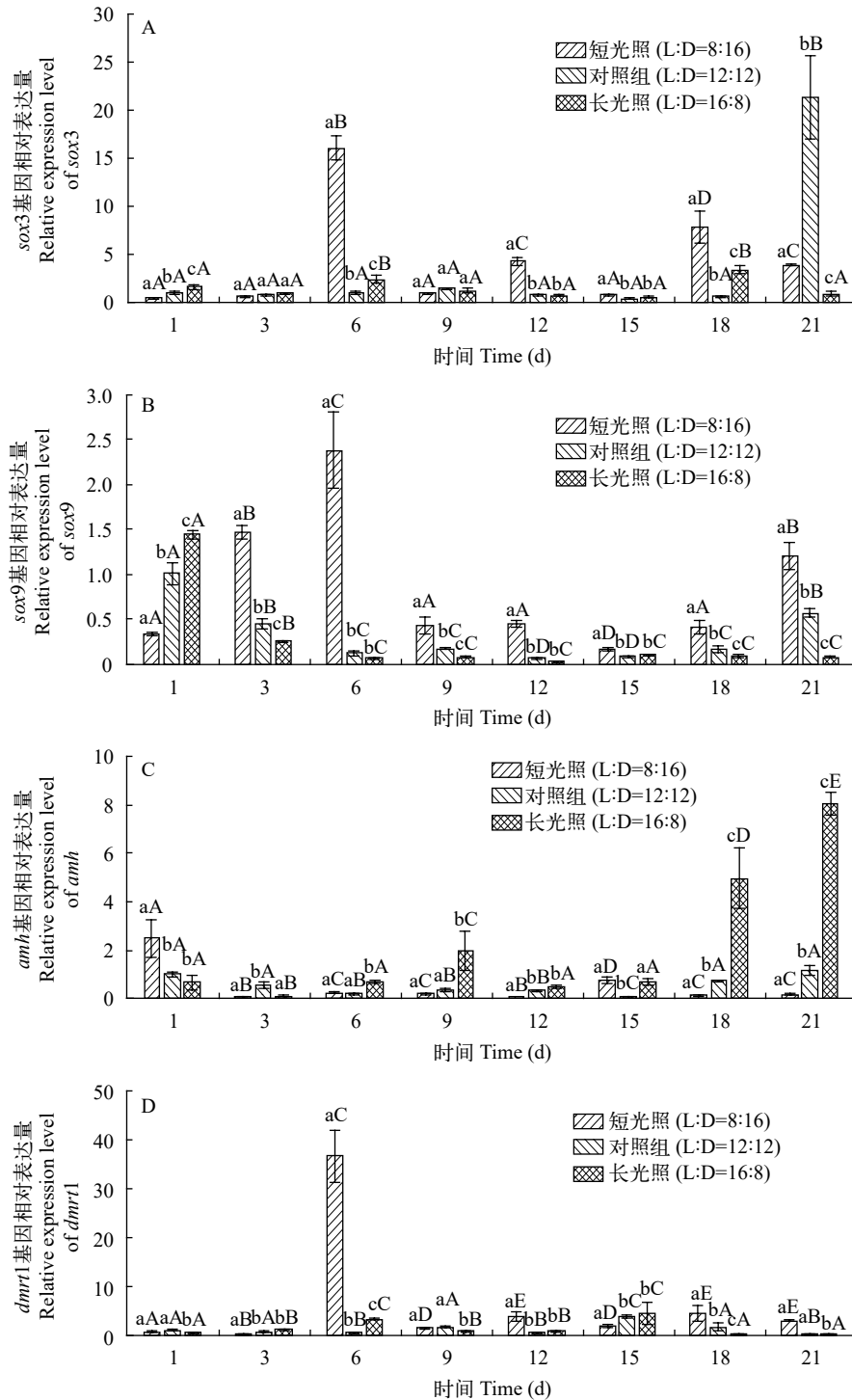


图5 不同光周期下许氏平鲈精巢分化相关基因mRNA相对表达水平(A、B、C和D分别为*sox3*、*sox9*、*amh*和*dmrt1* mRNA的相对表达水平)

Fig. 5 The relative mRNA expression level of testis differentiation related genes in *Sebastes schlegelii* under different photoperiod condition (A, B, C and D showed the relative mRNA expression level of *sox3*, *sox9*, *amh* and *dmrt1*, respectively)

3组的*cyp19a1a*的表达量处于较高水平,可能是由于此时是卵巢分化时期,21d时均已降低到最低水平,但长光照组表达量相对较高。结合组织切片初步推断,性腺分化时期光周期为L:D=12:12时,性腺分化偏雌性发育,较长的光照时间可能导致卵巢发育速度加快,短光照可能使精巢分化速度加快。

在鱼类中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^[21]。有研究表明,核受体也可以调控芳香化酶^[22]。在本研究中,ER β 2、*foxl2*和*cyp19a1a*的表达水平的总趋势基本一致,ER β 2的表达可能也和*cyp19a1a*的表达有关。21d时,在短光照组中ER β 2的表达显著上升,说明ER β 2可能在精巢的分化中也起一定的作用。在金钱鱼^[6]的研究表明,雌激素受体可能在精巢和卵巢发育中都具有重要的作用。在甲状腺激素诱导斑马鱼(*Danio rerio*)^[23]雄性化的研究中,性腺分化期间,*esr1*、*esr2a*和*esr2b*的表达水平下降。而在本研究中ER α 与ER β 2、*foxl2*和*cyp19a1a*的表达模式不同,在短光照组中,除了第1天处于较高水平,之后一直处于较低水平,长光照组的ER α 表达水平基本比其他两组都高,对照组次之。这说明短光照可能抑制了ER α 的表达,长光照可能会促进ER α 的表达,但在性腺分化中起的作用并不大。

*foxl2*基因是目前发现的最早的脊椎动物卵巢分化的标志性启动基因,对卵巢芳香化酶和卵巢分化起重要作用^[17]。*foxl2*在乌鳢(*Channa argus*)^[24]早期性腺分化中起重要作用,在1—11日龄表达显著上调,27日龄时在卵巢中表达量升高。有研究表达表明,*foxl2*参与*cyp19a1a*的上游调节,*foxl2*和*cyp19a1a*的表达具有显著的正相关关系^[25]。在本研究中,*foxl2*表达水平总趋势与*cyp19a1a*的一致,开始时处于较高水平可能是由于此时期为卵巢分化时期,精巢未分化,随着卵巢的逐渐发育,*foxl2*和*cyp19a1a*的表达逐渐降低,最后稳定在较低水平。在短光照处理的第6天,*foxl2*的相对表达水平突然上升,可能是由于样品的原因,具体仍需进一步研究。光周期为L:D=12:12在21d时*foxl2*相对表达水平较其他两组显著上升,这与组织切片结果一致,进一步说明非自然光照有可能影响性腺的发育和分化。

*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,该基因被认为是性别分化基因,与雌雄性别发育相关^[17,26]。Sutton等^[27]的研究表明,特殊品系的小鼠中*sox3*基因通过介导*sox9*表达上调的途径诱导精巢的分

化。常重杰等^[28]研究发现,大鳞副泥鳅(*Paramisgurnus dabryanus*)的*sox9*基因的表达水平在精巢中显著较高,可能精巢分化与形成有一定的关系。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*基因上游调节基因,调节*sox3*和*dmrt1*的转录表达。*sox3*、*sox9*和*dmrt1*基因在实验后期表达量逐渐升高可能与精巢分化较晚有关。结合组织切片结果,短光照组的*sox9*和*dmrt1*的表达水平显著上升可能与精巢的分化有关,进一步说明,短光照有利于精巢的分化。

目前对*amh*基因的研究表明,虽然在硬骨鱼类中没有缪勒氏管的存在,但在其性腺中也检测到了*amh*,这说明*amh*可能在鱼类性腺分化和雄性性腺的维持中起一定的作用^[29]。在斑马鱼^[30]性腺分化中,*amh*的表达呈性别二态性,在31日龄的幼鱼的精巢中*amh*较高。在本实验后期*amh*的相对表达水平逐渐升高,这可能与精巢的后分化有关。但在21d时,*amh*与*sox3*、*sox9*和*dmrt1*基因的表达模式不同,在长光照下*amh*的表达显著上升,随着光照时间的增长*amh*的表达水平逐渐上升,初步推测,*amh*可能与卵巢分化有一定的关系。

本研究通过对许氏平鲈30 dph的仔稚鱼进行不同光周期处理,对其性腺分化及发育情况进行探索,发现非自然的光周期尤其是较短的光照,均会不同程度地影响性腺分化时期性腺发育程度,并且短光照会导致部分性腺雄性化;E₂水平在非自然光周期影响尤其是在短光照下更早出现峰值,而T在不同处理下水平平均较高;4个卵巢分化相关基因*cyp19a1a*、ER α 、ER β 2和*foxl2*的相对表达水平在短光照处理下均受到抑制,联系组织切片结果可发现,短光照在一定层面上影响卵巢的发育,导致性腺雄性化;4个精巢分化相关基因*sox3*、*sox9*、*amh*和*dmrt1*的相对表达水平未见明显规律,可能与精巢分化时间较晚有关。综合而言,较短的光照会影响性腺的发育以及性腺的分化,抑制卵巢分化基因的表达,诱导原始性腺雄性化。

参考文献:

- [1] Brown E E, Baumann H, Conover D O. Temperature and photoperiod effects on sex determination in a fish [J]. *Journal of Experimental Marine Biology & Ecology*, 2014(461): 39-43.
- [2] Baroiller J F, D'Cotta H. Environment and sex determination in farmed fish [J]. *Comparative Biochemistry & Physiology Toxicology & Pharmacology Part C*,

- 2001(130): 399.
- [3] Huber M, Bengtson D A. Effects of photoperiod and temperature on the regulation of the onset of maturation in the estuarine fish *Menidia beryllina* (Cope) (*Atherinidae*) [J]. *Journal of Experimental Marine Biology & Ecology*, 1999, **240**(2): 285-302.
 - [4] Shin H S, Jin A S, Ji Y C, *et al.* Effects of various photoperiods on Kisspeptin and reproductive hormones in the goldfish [J]. *Animal Cells & Systems*, 2014, **18**(2): 109-118.
 - [5] Jeng S R, Wu G C, Yueh W S, *et al.* Gonadal development and expression of sex-specific genes during sex differentiation in the Japanese eel [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2018(257): 74-85.
 - [6] Li H, Zhang J P, Lian Y, *et al.* Cloning and expression analysis of *era*, *erβ1* and *erβ2* genes from *Scatophagus argus* [J]. *Journal of Biology*, 2017, **34**(2): 40-45. [李红, 张金鹏, 廉颖, 等. 金钱鱼雌激素受体 era 、 $er\beta1$ 和 $er\beta2$ 克隆及表达分析 [J]. *生物学杂志*, 2017, **34**(2): 40-45.]
 - [7] Baroiller J F, Guiguen Y. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in gonochoristic fish [J]. *Genes and Mechanisms in Vertebrate Sex Determination*, 2001: 177-201.
 - [8] Shi D, Wen H S, He F, *et al.* The physiology functions of estrogen receptor α (ER α) in reproduction cycle of ovoviparous black rockfish, *Sebastes schlegeli* Hilgendorf [J]. *Steroids*, 2011, **76**(14): 1597-1608.
 - [9] Wen H S, Lü L K, Li L M, *et al.* Effect of temperature on hematological physiological and biochemical parameters and gene expression in male *Sebastes schlegelii* [J]. *Journal of Ocean University of China*, 2016, **46**(11): 44-51. [温海深, 吕里康, 李兰敏, 等. 急性高温胁迫对雄性许氏平鲈血液生理生化及相关基因表达的影响 [J]. *中国海洋大学学报*, 2016, **46**(11): 44-51.]
 - [10] Espigares F, Rocha A, Gómez A, *et al.* Photoperiod modulates the reproductive axis of european sea bass through regulation of *kiss1* and *gnrh2* neuronal expression [J]. *General & Comparative Endocrinology*, 2017, (240): 35-45.
 - [11] Zhu F, Zhang Z Y, Xu X M, *et al.* Preliminary study on growth and gonadal development of reared under different photoperiods [J]. *Marine Sciences*, 2016, **40**(9): 32-38. [祝斐, 张志勇, 徐献明, 等. 光周期对松江鲈鱼生长和性腺发育影响的初步研究 [J]. *海洋科学*, 2016, **40**(9): 32-38.]
 - [12] Qiu D G, Xu S H, Liu Y, *et al.* Effects of different types of environment light on the growth performance and feeding of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in recirculating aquaculture systems [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2015, **22**(1): 68-78. [仇登高, 徐世宏, 刘鹰, 等. 光环境因子对循环水养殖系统中大西洋鲑生长和摄食的影响 [J]. *中国水产科学*, 2015, **22**(1): 68-78.]
 - [13] Frisch A. Sex-change and gonadal steroids in sequentially-hermaphroditic teleost fish [J]. *Reviews in Fish Biology & Fisheries*, 2004(14): 481-499.
 - [14] Guiguen Y, Baroiller J F, Ricordel M J, *et al.* Involvement of estrogens in the process of sex differentiation in two fish species: the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and a tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Molecular Reproduction & Development*, 1999(54): 154-162.
 - [15] Xu Y J, Liu X Z, Wang Q Y, *et al.* Relationships between serum sex steroids levels and gonadal development and photothermal regulation during the annual maturation of captive *Cynoglossus semilaevis* Günther [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2011, **42**(1): 67-74. [徐永江, 柳学周, 王清印, 等. 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)血浆性类固醇激素表达与卵巢发育及温光调控的关系研究 [J]. *海洋与湖沼*, 2011, **42**(1): 67-74.]
 - [16] Qu Q Z, Sun D J, Liu X. Content of 17 β -E2 and testo in blood of trout under artificial control of photoperiod [J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 1991(1): 33-35. [曲秋芝, 孙大江, 刘雄. 人工控制光周期条件下虹鳟血浆中17-雌二醇和睾酮的浓度变化 [J]. *水产学杂志*, 1991(1): 33-35.]
 - [17] 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, **13**: 2981-2986. [路畅, 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, **13**: 2981-2986.]
 - [18] Zheng Y, Wang Z Z, Chen J Z. Progresses on the study of sex differentiation genes in fish [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, **39**(4): 798-810. [郑尧, 王在照, 陈家长. 调控鱼类性腺分化基因的研究进展 [J]. *水生生物学报*, 2015, **39**(4): 798-810.]
 - [19] 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 & Comparative Endocrinology*, 2010, **165**(3): 352-366.
 - [20] Huang B, Yang X Y, Dai Q, *et al.* Effect of aromatase inhibitor on expression of CYP19A, DMRT1, and gonadal sex differentiation in *Takifugu obscurus* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, **20**(1): 68-74. [黄波, 杨小玉, 戴奇, 等. 芳香化酶抑制剂对暗纹东方鲀CYP19A、DMRT1基因表达及性腺分化的影响 [J]. *中国水产科学*, 2013, **20**(1): 68-74.]
 - [21] Hu X Q, Wang J J, Wang H P, *et al.* Full-length cDNA cloning of androgen receptor gene from rare minnow (*Gobiocypris rarus*) and effect of endocrine disrupting chemicals on its mRNA expression [J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2011, **20**(2): 8-14. [胡晓齐, 王晶晶, 王厚鹏, 等. 稀有鮡鲫雄激素受体基因的克隆和内分泌干扰物对其表达的影响 [J]. *西北农业学报*, 2011, **20**(2): 8-14.]
 - [22] Yanase T, Mu Y M, Nishi Y, *et al.* Regulation of aromatase by nuclear receptors [J]. *Journal of Steroid Bio-*

- chemistry & Molecular Biology*, 2001, **79**(1-5): 187-192.
- [23] 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 & Comparative Endocrinology*, 2016(235): 38-47.
- [24] 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 & Biochemistry*, 2015(41): 1419-1433.
- [25] Li C G, Hui W, Hong J C, *et al.* Differential expression analysis of genes involved in high-temperature induced sex differentiation in *Nile tilapia* [J]. *Comparative Biochemistry & Physiology Part B Biochemistry & Molecular Biology*, 2014(177): 36-45.
- [26] 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. [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.]
- [27] Sutton E, Hughes J, White S, *et al.* Identification of *SOX3* as an XX male sex reversal gene in mice and humans [J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2011, **121**(1): 328-341.
- [28] Chang Z J, Zhou R J, Yu Q X. The conservative region sequence analysis of *PdSox9* in *Paramisgurnus dabryanus* [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2000, **27**(2): 121-126. [常重杰, 周荣家, 余其兴. 大鳞副泥鳅中 *Sox9* 基因保守区的序列分析 [J]. 遗传学报, 2000, **27**(2): 121-126.]
- [29] 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. [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.]
- [30] Rodríguezmarí A, Yan Y L, Bremiller R A, *et al.* Characterization and expression pattern of zebrafish Anti-Müllerian hormone (*Amh*) relative to *sox9a*, *sox9b*, and *cyp19a1a*, during gonad development [J]. *Gene Expression Patterns Gep*, 2005(5): 655-667.

EFFECTS OF PHOTOPERIOD ON MORPHOLOGY, SEX HORMONE LEVELS AND GENE EXPRESSION OF GONADAL DIFFERENTIATION OF BLACK ROCKFISH (*SEBASTES SCHLEGELII*)

LÜ Li-Kang, ZHANG Si-Min, LI Ji-Fang and WEN Hai-Shen

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

Abstract: Genetic sex determination (GSD) along with environmental sex determination (ESD) are two crucial sex determination mechanisms. This study investigated gonadal differentiation mechanisms under 3 different photoperiod conditions (long light photoperiod: L:D=8:16; short light photoperiod: L:D=16:8; control: L:D=12:12) of black rockfish (*Sebastes schlegelii*) larvae, which are demersal at coast in the mid and high latitudes, at 35 dpb (day post birth). The result showed that the unnatural photoperiod conditions impacted the gonadal differentiation and development with the short light photoperiod condition to induce gonad masculinization. Estrogen level (E_2) first reached the peak value in the short light photoperiod condition, while androgen (T) level reached the peak value at 9d after treatment in all three conditions. The short light photoperiod condition significantly reduced the expression of the ovary differentiation related genes such as *ERα*, *ERβ2* and *foxl2* ($P<0.05$). Consider that the testis differentiation time was relatively late, the testis differentiation related genes of *sox3*, *sox9*, *amh*, and *dmrt1* did not impact by photoperiod. In conclusion, short photoperiod could affect the gonad differentiation and development by restrain the ovary differentiation related genes expression and induce primitive gonad masculinization.

Key words: Gonad differentiation; Photoperiod; Sex hormone; Gene expression; Black rockfish