

# 条斑星鲈卵巢发育规律和性类固醇激素周年变化研究

倪娜<sup>1,2</sup> 柳学周<sup>2\*</sup> 徐永江<sup>2</sup> 赵明<sup>1,2</sup> 曲建忠<sup>3</sup>

(<sup>1</sup> 中国海洋大学水产学院, 266003)

(<sup>2</sup> 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  
青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室, 266071)

(<sup>3</sup> 青岛忠海水产有限公司, 266414)

**摘要** 采用组织学方法、形态测量法、放射免疫法(RIA)等技术方法,研究了人工养殖条件下条斑星鲈雌性亲鱼卵巢发育成熟和性类固醇激素的周年变化规律。结果表明,条斑星鲈属于非同步分批产卵类型。卵母细胞按其组织学特点可分为 6 个时相,卵巢发育依据其形态特征可划分为相应的 6 个时期。卵巢周年发育过程中,性腺指数(GSI)、肝脏指数(HSI)和肥满度(CF)发生变化,表现出与性腺发育协同一致的变化规律。统计分析表明,卵巢周年发育过程中,GSI 和 HSI 值与 CF 值都存在显著的正相关关系,GSI 值的变化与水温调控呈显著的负相关关系。亲鱼血浆中雌二醇(E<sub>2</sub>) 在 6 月份开始升高,9 月份达到周年周期中的第 1 个小高峰,翌年 2 月份,E<sub>2</sub> 表达水平达到最高峰值,4 月产卵结束后,E<sub>2</sub> 表达水平降低并维持较低水平至下一个生殖季节。血浆中睾酮(T)含量在 7 月达到第 1 个峰值,并在翌年 1 月份达到第 2 个峰值,在 4 月份产卵后降至最低水平并维持至下一个生殖季节。统计分析表明,E<sub>2</sub> 与 T 存在正相关关系,E<sub>2</sub> 与光周期调控存在正相关关系,同时与 GSI 和 CF 呈弱的正相关关系。

**关键词** 条斑星鲈 卵巢发育 组织学 性类固醇激素

**中图分类号** S965.399 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2011)03-0016-10

## The study of gonadal development and steroid hormone annual change in barfin flounder *Verasper moseri*

NI Na<sup>1,2</sup> LIU Xue-zhou<sup>2\*</sup> XU Yong-jiang<sup>2</sup> ZHAO Ming<sup>1,2</sup> QU Jian-zhong<sup>3</sup>

(<sup>1</sup> Fishery Colloge, Ocean University of China, Qingdao 266003)

(<sup>2</sup> Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, 266071)

(<sup>3</sup> Qingdao Zhonghai Fishery Co., Ltd., 266414)

**ABSTRACT** The annual ovarian maturation cycle and the variation of correlated plasma sex steroids levels were studied by employing light microscopy and morphometric methods combined with radioimmunoassay. In addition, the relationships between GSI, CF, HSI, sex steroids

国家鲆鲽类产业技术体系建设项目(nycytx-50)、国家“863”计划项目(2006AA10A414、2010AA10A402)和青岛市成果转化项目(09-2-3-15-chg)共同资助

\* 通讯作者。E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85830506

收稿日期: 2010-07-22; 接受日期: 2011-03-04

作者简介: 倪娜(1986-), 女, 硕士研究生, 主要从事鱼类繁殖生理研究。E-mail: nnxinfeixiang@163.com, Tel: 13869894857

and temperature, photoperiod were investigated through statistical analysis. Results showed that barfin flounder features asynchronous oocyte development and batch spawnings. The oocyte growth included six phases, and six stages in ovary maturation cycle accordingly. Gonadosomatic index (*GSI*), hepatosomatic index (*HSI*) and condition factor (*CF*) were all found to increase prior to, or during the peak phase of vitellogenic growth corresponding to the gonad development. Statistical analysis revealed that *GSI* was positively correlated with *CF* while *HSI* showed negative relationship with *CF*. Temperature played more important role in regulating the gonad development compared with photoperiod based on the correlation analysis between *GSI*, temperature and photoperiod. During spawning the serum estradiol level began to increase in June (stage III) and reached the first relatively lower peak in September and peaked in February. After the spawning, it dropped down to a relative low level and maintained until the next reproductive cycle. The testosterone level achieved the first relatively high peak in July and peaked in January, which was a month earlier than that of estradiol. A positive relationship was found between estradiol and testosterone level. Statistical analysis revealed that a positive relationship existed between photoperiod and estradiol level. In addition, the estradiol level showed positive correlations with *GSI* and *CF*. These results could highlight the reproductive cycle of captive barfin flounder females, and also serve as useful tools for broodstock breeding and determination of timing for hormone induced spawning.

**KEY WORDS** *Verasper moseri* Ovary development Histology  
Serum steroid hormone

条斑星鲽 *Verasper moseri*, 属鲽形目 Pleuronectiformes, 鲽亚目 Pleuronectoridei, 鲽科 Pleuronectidae, 星鲽属 *Verasper*, 为大型冷温性底栖比目鱼种, 主要分布于日本茨城县以北的太平洋沿岸和若狭湾以北的日本海沿岸, 我国黄海和渤海也曾有分布。条斑星鲽具有生长快、耐低温、抗逆能力强的优良特性, 是一种适宜于人工养殖和资源增殖开发的优良品种。

为了开发利用这一优良海水养殖品种, 学者们围绕条斑星鲽的人工繁殖技术开展了诸多研究。Kayaba 等 (2003a) 利用温度刺激法获得了条斑星鲽的自然产卵, 但是产卵效果不理想, 表现为产卵量少、受精率和孵化率低、不稳定, 同时观察到卵巢内过熟的卵子可导致未成熟卵子质量低下 (Kayaba *et al.* 2003b); Higashino 等 (2002) 观察了条斑星鲽卵子发生早期的形态特征, 但未完成整个卵母细胞发育阶段的观察; Kayaba (2005) 研究了 1 龄和 2 龄条斑星鲽成鱼在人工养殖条件下卵巢发育的基本规律, 但未能阐述性成熟亲鱼 (3 龄以上) 性腺发育的年周期特征和内分泌规律是否同 1 龄和 2 龄成鱼一致。我国学者对条斑星鲽繁殖生物学的研究主要集中在早期发育生物学 (柳学周等 2009b)、环境因子影响 (王妍妍等 2008)、染色体核型 (王妍妍等 2009) 等方面, 尚未开展亲鱼性腺发育的生理和内分泌特征研究。2007 年, 中国水产科学研究院黄海水产研究所科研人员采用温度、光照和缓释激素综合诱导方法调控星鲽性腺发育成熟, 通过人工采卵受精技术获取了批量受精卵, 成功突破了条斑星鲽的人工繁育技术, 但目前亲鱼调控产卵技术尚不稳定, 人工繁殖过程中经常遇到亲鱼性腺发育不成熟、未能产卵、激素诱导产卵失败的现象, 亲鱼整体成熟率较低, 批量受精卵的获取尚依赖于大批量的亲鱼, 造成这种现象存在的根本原因在于未能认识亲鱼在人工养殖条件下卵巢发育的生理学和内分泌规律。因此, 本文采用组织学、放射免疫技术、形态测量方法系统研究了人工养殖条件下条斑星鲽卵巢发育的组织学特征、性类固醇激素 (雌二醇和睾酮) 的季节性表达变化规律及其与环境因子调控的关系, 以期深入认识条斑星鲽的卵巢发育的生理学和内分泌机制, 充实其繁殖生物学资料并为其人工繁殖技术的发展提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验鱼及取样方法

实验于2008~2009年在青岛忠海水产有限公司和山东莱州明波水产有限公司进行。实验用幼鱼为莱州明波水产有限公司繁殖的F1代苗种,性成熟亲鱼取自青岛忠海水产有限公司培育的3龄以上的性成熟的人工亲鱼。幼鱼取样时间为6、9、12月龄,每次取样5~7尾。性成熟亲鱼每月取样1次,每次取样2~3尾,取满1周年。实验用亲鱼全长39~57 cm,体重1 300~3 000 g。亲鱼周年培育水温7~18 °C,盐度27~31,pH 8.0~8.4,溶解氧6 mg/L以上,日换水率400%~600%。亲鱼饵料为新鲜杂鱼。日投喂两次,投喂量为鱼体重的1%~2%,及时清除残饵,排污。

实验鱼使用300mg/L的MS222麻醉后测量其生物学特征,幼鱼取性腺的整体,亲鱼取性腺的前、中、后部,样品在Davis固定液中固定24h后转入70%酒精保存。性成熟亲鱼每月抽血取样1次,每次5~7尾,取样与性腺取样同步,满1周年。采用背面尾部静脉抽血方法取血,使用1ml无菌注射器。每次取样选择性腺发育基本一致的雌性亲鱼,每尾亲鱼抽血1.5ml,保存在1.5 ml Eppendorf离心管中,12 000 r/min离心10min后,分离上层血清,保存在-40°C冰箱备用。

### 1.2 组织切片、观察

固定的性腺组织经梯度酒精脱水、透明、包埋,切成5~8 μm的切片,H.E染色,中性树胶封片,在显微镜(NIKON 90i)下拍照观察。用目微尺测量卵径、核径,计算核质比,统计不同发育时期卵母细胞的核仁数。

每尾鱼的性腺样品均做连续切片,随机选取30个视野,测量每个视野中所有包含细胞核的卵母细胞。卵母细胞和细胞核直径的观察与计数:测量卵母细胞的最大直径和细胞核直径,将每次取样的所有鱼的切片观察数据求平均值作为该时相卵母细胞的数量参数,用 $t$ 检验法检验其差异。根据Мейен(1939)和刘筠(1993)的标准,结合卵母细胞发育的结构特点,对卵母细胞发育进行分期,卵巢切面中面积超过50%或者面积最大的某一细胞时相即对应该卵巢的分期。

### 1.3 性类固醇激素测定

采用林浩然等(2007)的放射免疫法(RIA),并适当进行修改来测定血浆中雌二醇( $E_2$ )和睾酮(T)的表达含量,测定数据以平均值±标准差来表示。

### 1.4 测量和数据分析

对实验鱼进行生物学测量[体重(BW)、体长(BL)、内脏重(VW)、性腺重(GW)、肝脏重(LW)]。性腺发育相关指数计算:性腺指数( $GSI$ ) =  $GW/(BW-VW) \times 100$ ;肝脏指数( $HSI$ ) =  $LW/(BW-VW) \times 100$ ;肥满度( $CF$ ) =  $[BW/(BL)^3] \times 100$ 。采用Duncan's test和Tukey test对 $E_2$ 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;采用偏相关分析法分析温度和光周期与雌二醇、睾酮、 $GSI$ 、 $HSI$ 和 $CF$ 的关系,取差异显著性水平( $P$ )为0.05, $P < 0.05$ 视为差异显著,反之不显著。

## 2 结果

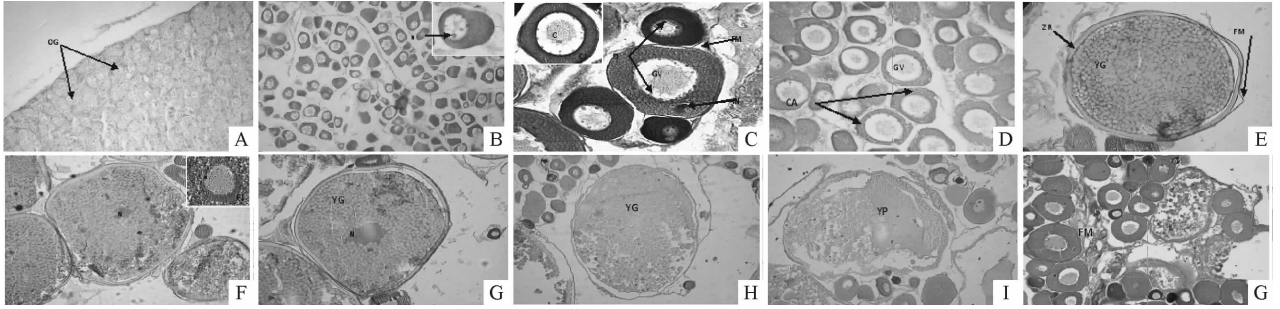
### 2.1 卵巢发育各期的组织学观察

#### 2.1.1 卵巢发育分期

根据卵母细胞的发育时相,以各期中切片视野中数量或者面积占优势的卵母细胞类型以及卵巢发育形态、颜色、成熟系数作为卵巢划分依据,将性腺年周期发育划分为6期。

### 2.1.1.1 I期卵巢

半透明且前部延伸短小,肉眼难分辨雌雄,表面无血管或甚细弱。9月龄前,条斑星鲈卵巢发育停留在I期。显微镜下观察,卵巢中生殖细胞以第I时相卵母细胞为主,细胞大,形状圆形或者椭圆形,卵原细胞以细胞团或者卵索的结构不断进行有丝分裂、增殖(图1-A)。卵原细胞直径 $16.5\sim 26.3\mu\text{m}$ ,切面可见核中央大核仁1~2个。



A. I时相:卵原细胞。400×

B. II时相早期:卵母细胞形状不规则,核仁大,右上角放大图示单个卵母细胞。200×

C. II时相晚期(核仁周期):胞质中卵黄核,示生殖泡。200×

D. III时相:皮质液泡生成,滤泡膜变为双层。400×

E. IV时相早期:卵黄颗粒逐渐充满细胞质,示放射带、卵黄颗粒和滤泡膜。

F. IV时相中期:卵黄颗粒充满胞质,卵黄颗粒直径变大(右上角放大图示核及核仁)。100×

G. IV时相晚期:核偏位,移向胞质的边缘,核膜崩解。100×

H. V时相早中期:核仁崩解,卵黄颗粒充满胞质,粒径增大,部分开始融合。100×

I. V时相晚期:卵黄颗粒融合为卵黄板且卵黄板体积不断增大,水合作用明显。100×

J. 排空后的滤泡细胞:卵母细胞排空后的滤泡膜和大量退化为II时相的卵母细胞。100×

A. Phase I oogonium (OG)

B. Oocyte at early phase II, showing irregular shape of oocytes and big nucleolus (n)

C. Oocyte at late phase II (perinucleolus stage), showing yolk nucleus (YN) and geminal vesicle (GV)

D. Oocyte at phase III, showing cortical alveoli (CA) appeared in cytoplasm

E. Oocyte at early phase IV, yolk globules (YG) increased in number and volume

F. Oocyte at mid phase IV, yolk globules (YG) increased

G. Oocyte at late phase IV, position of the nucleus started to migrate towards the animal pole, nucleus membrane collapsed

H. Oocyte at early phase V, nucleolus collapsed, the cytoplasm was filled with bigger yolk globules, incipient coalescence of yolk globules started

I. Oocyte at late phase V, yolks plate volume enlarged, oocyte experienced hydration stage

J. Rudimental follicle membrane (FM) after spawning

YN: 卵黄核;GV: 胚泡;FC: 滤泡细胞;CA: 皮质液泡;ZR: 放射膜;YG: 卵黄球;YP: 卵黄板;FM: 滤泡膜

图1 不同时相卵母细胞发育形态特征

Fig. 1 The morphological characteristics of oocytes at different developmental phases

### 2.1.1.2 II期卵巢

长度增加,呈前部钝圆逐渐往后细长延伸的圆锥形,呈淡红色,表面被覆1层淡红色被膜,表面可见微细的血管,肉眼已能与精巢相区分,尚看不清卵粒。此期卵巢以处于小生长期的II时相初级卵母细胞为主,呈不规则椭圆形或长椭圆形,胞质呈强嗜碱性反应。胞质中常可见一个深蓝色圆形小体的卵黄核,核中可见灯刷状染色体。细胞核大且圆,核膜清晰,核仁数目逐渐由1~2个变为多个,核仁体积减小,逐渐由中心至核膜周边分布。卵膜外有1层长梭形的滤泡细胞围成的、呈嗜碱反应的滤泡膜。根据初级卵母细胞核的大小以及核仁数目和分布情况、以及卵黄核的位置形态特征,将其划分为两个时期。

早期:细胞圆形、椭圆形或多角形。卵母细胞直径 $29\sim 77\mu\text{m}$ ,核径 $19\sim 48\mu\text{m}$ 。细胞质强嗜碱性,核圆,多数稍偏一侧,核质疏网状,1~3个核仁分散于核质中(图1-B)。

晚期(核仁周期):卵母细胞直径 163~226  $\mu\text{m}$ ,核径 67~101  $\mu\text{m}$ ,核仁数 5~12 个。细胞圆形或椭圆形,核膜波纹状。靠近核的位置出现染色较深的卵黄核。核仁外移到核膜边缘(图 1-C)。

#### 2.1.1.3 III期卵巢

呈乳白色,扁平状,前部膨胀延长,毛细血管密布且有纵走的较大血管,肉眼可见卵粒。卵巢内以第III时相进入大生长期的初级卵母细胞为主,也有I、II、IV时相卵母细胞。III时相卵母细胞膜边缘出现大小不一的皮质液泡,随后液泡层数逐渐增多至数层。随着卵母细胞的发育,液泡逐渐变小,在液泡中间出现卵黄粒,开始分布在卵周部位,随后卵黄颗粒逐渐增多。卵母细胞直径 298~394  $\mu\text{m}$ ,核径 86~167  $\mu\text{m}$ ,核仁数 12~29 个。卵细胞膜和滤泡细胞之间形成了放射膜,有两层构成,靠近内侧的为放射带,此时放射条纹不清楚,外面的一层为透明带。

#### 2.1.1.4 IV期卵巢

卵粒大而饱满且极易从卵巢褶皱上脱落下来,外膜甚薄,密布粗大的血管。卵巢中同时存在II、III、IV和V时相卵母细胞,所占比例分别为 28.7%、7.5%、49.8%、14%,IV时相卵母细胞占优势地位。根据卵母细胞直径的大小、卵黄颗粒的积累情况和核(胚泡)的位置可以把IV时相卵母细胞分为早期、中期和晚期3个发育阶段。早期,卵母细胞为不规则的椭圆形,卵黄颗粒逐渐充满整个细胞,胞径 384~432  $\mu\text{m}$ ,核径 96~154  $\mu\text{m}$ ,核仁数 18~49 个。卵黄颗粒出现,放射带宽度 19.2~28.8  $\mu\text{m}$ (图 1-E)。中期,卵黄颗粒数目增多,体积增大,核开始移位,核膜呈锯齿形。放射膜厚度 32.03~35.6  $\mu\text{m}$ 。卵母细胞直径 480~556  $\mu\text{m}$ ,核径 86~134  $\mu\text{m}$ ,核仁数 9~53 个(图 1-F)。晚期,卵黄颗粒充满整个胞质,胞核靠近动物极,核膜崩解。卵母细胞直径 557~614  $\mu\text{m}$ ,核径 76~104  $\mu\text{m}$ ,核仁数 18~34 个。放射膜厚度达 36.1~42  $\mu\text{m}$ (图 1-G)。

#### 2.1.1.5 V期卵巢

卵巢完全成熟,外膜非常薄,血管发达,亲鱼开始产卵。卵母细胞完全成熟并脱离滤泡膜排放到卵巢腔中,提起亲鱼或轻压腹部就有成熟卵粒排出,遇水后迅速膨胀呈圆形。卵巢内卵母细胞组成为V、IV、III和II时相,分别占 45.7%、24.3%、11.4%、18.6%。卵母细胞胞质完全被卵黄颗粒充满,细胞核极化,核仁崩解,卵黄颗粒相互融合为卵黄板。放射膜和滤泡膜变得很薄,滤泡膜易脱离卵母细胞,为排卵前兆。V卵母细胞根据卵黄颗粒的融合过程及水化出现的时间分为两个发育时期。早期,卵母细胞直径 619~679  $\mu\text{m}$ ,部分卵母细胞切片中仍可见个别核仁。卵黄颗粒体积逐渐增大并开始融合(图 1-H)。水合期,卵黄颗粒水合作用明显,融合成较大的卵黄板,成为成熟的状态,卵母细胞直径 816~987  $\mu\text{m}$ (图 1-I)。卵母细胞脱离滤泡膜即将排出。

#### 2.1.1.6 VI期卵巢

卵巢萎缩,卵巢膜松弛变厚,表面血管萎缩充血,呈暗红色。组织切片观察,卵巢中存在大量褶皱的空滤泡,卵黄颗粒大量液化吸收成板状,卵巢中含有II、III、IV、V、VI时相卵母细胞。随着卵巢吸收空滤泡和退化的卵母细胞,卵巢回复发育到II期(图 1-J)。

### 2.1.2 卵巢发育的年周期变化规律

条纹星鲷卵巢发育具有明显的周期性。8月,卵巢开始发育至II期;11月,温度调节开始,卵巢成熟系数显著增加,性腺发育到III期。12月,随着光周期调控的开始,性腺发育达到IV期;1月,性腺发育进入到成熟的V期,进入产卵期,至4月份结束。人为调控条件下,性腺发育成熟的雌鱼可达到70%~80%。整个性腺年周期发育成熟的过程可分为3个阶段:育肥生长期、产卵期、休整期。在条纹星鲷繁殖生产过程中发现,埋植缓释激素催产的适宜时期为卵巢发育到IV期的早中期,此时使用缓释激素诱导亲鱼成活率和性腺成熟率高。

## 2.2 GSI、HSI、CF的季节变化

本研究表明,7月,亲鱼GSI值处于较低水平,表明卵巢发育尚未启动;8月后,随水温上升,卵巢发育启动,GSI开始升高;11月后,水温调节开始(下降),GSI显著升高,表明性腺进入快速发育期。12月,光周期调控开始,卵巢发育加速,并在翌年1月(光周期 16L:8D;水温 8 $^{\circ}\text{C}$ )时达到峰值 21.38,性腺发育成熟(V期),进入产卵期,并在2~3月份保持较高的GSI值(大于18)。在产卵结束后,GSI迅速下降并保持较低水平至下次发育周期开始前。各月份间的性腺指数值差异明显( $P<0.05$ )(图 2)。

肝脏指数(HSI)变化:7~10月,HSI保持相对较低水平(2.74~3.44);11月,温度调节开始,HSI达到峰值4.46,并在12月后开始下降直至翌年1月(2.30),表现出与GSI相反的变化;2~3月,HSI有所增高并在4月繁殖季节结束后再次下降。各个取样月份肝脏指数的变化差异不明显( $P>0.05$ )(图2)。

亲鱼肥满度(CF)在12月达峰值2.10,虽在其后有所下降,但在1~2月保持较高的水平(1.87~1.94),4月繁殖季节结束后CF逐渐下降并在6月达到最低值1.13。统计分析表明,6月CF值与其他月份差异显著( $P<0.05$ )(图3)。

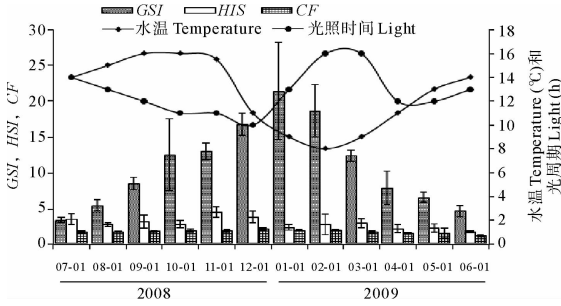


图 2 雌鱼性腺指数(GSI)、肝脏指数(HSI)和肥满度(CF)的周年变化及其与水温 and 光周期的关系

Fig. 2 Gonadosomatic index,hepatosomatic index and condition factor variation in ovary at different developmental stages

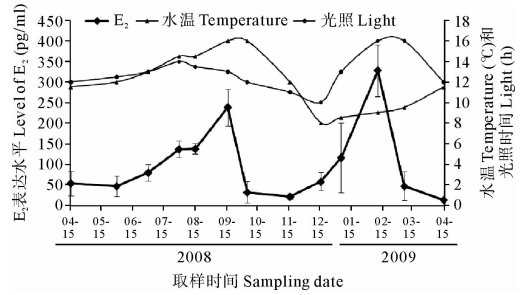


图 3 雌鱼血浆中雌二醇的周年变化

Fig. 3 Year round variations of plasma 17β-estradiol levels

统计分析显示,GSI值与HSI值存在负相关关系( $r=-0.51, P>0.05$ ),与CF值存在显著的正相关关系( $r=0.796, P<0.05$ )。HSI值与CF值存在显著的正相关关系( $r=0.731, P<0.05$ )。GSI值的变化与光周期调控呈不显著负相关关系( $r=-0.45, P>0.05$ ),而与水温调控呈显著的负相关关系( $r=-0.707, P<0.05$ ),提示水温是促进性腺发育的重要环境因子。HSI值的变化与光周期调控呈负相关关系( $r=-0.171, P>0.05$ ),而与水温调控呈正相关关系( $r=0.114, P>0.05$ );CF值的变化与光周期和水温调控都呈负相关关系(光周期: $r=-0.373, P>0.05$ ;水温: $r=-0.373, P>0.05$ )。

### 2.3 性类固醇激素表达的周年变化

条斑星鲈雌性亲鱼血浆中雌二醇(E<sub>2</sub>)表达水平在6月开始升高,9月达到年周期中的第1个小高峰(118.83 pg/ml),11月下降至全年最低水平(13.08 pg/ml)。12月后,温光调控开始,水温下降,光照时间延长,雌二醇表达水平上升。翌年2月,雌二醇表达水平达到最高峰值(163.97 pg/ml),亲鱼进入产卵期;其后随着水温的逐渐下降和光照时间的缩短,雌二醇表达水平下降,4月份排卵后,雌二醇表达水平降至42 pg/ml以下并保持较低水平至下一个生殖季节(图3)。2、8和9月的E<sub>2</sub>值与其他月份差异显著( $P<0.05$ )。E<sub>2</sub>与T的比值在9月达到最大(6.34),在2月再次达到较高比值(4.31)。

血浆中睾酮(T)的含量在7月(14 °C)达第1个峰值(80.25 mg/dl),其后表达水平下降至18.9 mg/dl的较低水平;12月后,温光调控开始,睾酮表达水平持续升高,在翌年1月达到第2个峰值(8 °C,光照时长13 h),随后其表达水平逐渐下降,在4月排卵后降至最低水平并维持至下一个生殖季节(图4)。4、7月的T值与其他月份差异显著( $P<0.05$ )。

统计分析表明,E<sub>2</sub>与T存在正相关关系( $r=0.309, P>0.05$ ),E<sub>2</sub>与水温变化不存在显著的相关关系( $r=0.065, P>0.05$ ),而与光周期调控存在正相关关系( $r=0.572, P>0.05$ )。T与水温变化呈弱的正相关关系( $r=0.162, P>0.05$ ),而与光周期调控呈弱的负相关关系( $r=-0.157, P>0.05$ )。E<sub>2</sub>的变化与GSI和CF的变化呈弱的正相关关系(GSI: $r=0.171, P>0.05$ ;CF: $r=0.226, P>0.05$ ),而与HSI变化呈弱的负相关关系( $r=-0.075, P>0.05$ )。

### 3 讨论

本研究采用组织学手段、放射免疫技术、形态数量测量方法详尽报道了条斑星鲈在人工养殖条件下卵巢年周期发育的组织学和数量形态特征以及性类固醇激素( $E_2$ 和T)的表达变化规律,为其亲鱼的人工培育和生殖调控提供了技术依据。结果表明,条斑星鲈卵母细胞和性腺的发育成熟模式与其他已报道的海水硬骨鱼类相似(Rickey 1995;柳学周等 2009b)。

#### 3.1 条斑星鲈产卵及卵母细胞发育特征

鱼类的繁殖活动具有周期性,根据卵巢组织学特征和产卵习性把硬骨鱼类的产卵类型划分为一次性产卵和多次性产卵;根据卵母细胞的发育形态,把鱼类的卵巢分为完全同步型、分次同步型(或称分批同步型)和分批非同步型(施腺芳 1991)。本研究发现,在条斑星鲈不同发育时期的卵巢中,除I期、II期卵巢外,在III、IV、V、VI期卵巢中均存在两种或者两种以上不同发育时相的卵母细胞,如IV期卵巢内卵母细胞类型包括II、III、IV、V时相早卵母细胞,所占比例分别为28.7%、7.5%、49.8%、14%。V期卵巢内,除了占多数的V时相卵母细胞群外,还有II、III、IV时相卵母细胞,比例依次为45.7%、18.6%、11.4%、24.3%,这属于分批产卵型鱼类的典型特征,同欧洲鲷 *Solea solea* (Witthames *et al.* 1995)、半滑舌鲷 *Cynoglossus semilaevis* Günther 的产卵特征一致(柳学周等 2009a),而不同于冬鲈 *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum)的卵母细胞发育,其具有相对整齐的发育特征(Burton *et al.* 1984)。

鱼类初级卵母细胞在生长发育过程中都要经历卵黄发生和积累的过程,卵黄是鱼类配子和胚胎发育的营养及能量的主要来源。本研究发现,条斑星鲈卵母细胞发育过程中,液泡首先在质膜边缘出现,进入大生长期后卵黄颗粒开始出现,其后液泡数量减少而卵黄颗粒数量和体积增加,这与半滑舌鲷(柳学周等 2009a)一致,但与其他比目鱼类如大西洋牙鲆 *Paralichthys dentatus* (Merson *et al.* 2000)、欧洲黄盖鲈 *Limanda limanda* L. (Htun-Han 1978)不同,这些鱼类卵母细胞发育过程中液泡、油滴和卵黄颗粒同时出现,这种差异的原因除种群系统发生的差异之外,可能和鱼类生态类群不同有关,其生物学意义还有待于进一步研究。在卵黄发生前期,胞质中出现卵黄核及核仁外排的现象(方永强等 2004),本研究也观察到了该种现象,且卵黄核只存在于单层滤泡时期,进入卵黄形成期便不复存在,可能为细胞器核糖体和线粒体的产生、卵黄的形成做准备。陈文银等(2003)证明,排入细胞质中的核仁实质是核糖体大小亚单位,核仁外排入卵母细胞细胞质中,可能是卵黄形成开始的信号(Chopra *et al.* 1958;何德奎等 2001)。

#### 3.2 性腺指数、肝脏指数和肥满度的变化与卵巢发育的关系

性腺指数(GSI)、肝脏指数(HSI)和肥满度(CF)是评价鱼类性腺发育的良好的数量指标。GSI值的快速变化可直接反映出在产卵调控过程中亲鱼性腺的快速发育和生长。本研究表明,条斑星鲈GSI值在产卵期达到峰值,而在产卵结束后下降至较低水平,这种变化趋势与其他比目鱼类相似(García-López *et al.* 2007)。另外,在高体鲈 *Seriola dumerili* Risso (Micale *et al.* 1999)、花鲈 *Lateolabrax japonicus* Cuvier (Lee *et al.* 2002)中同样观察到类似表达特性,表明亲鱼性腺发育成熟对人工环境因子调控应答机制较好。统计分析表明,GSI值与HSI值存在负相关关系( $r = -0.51, P > 0.05$ ),表明卵巢卵母细胞的生长发育与肝脏能量储备之间为负反馈调节和应答机制,同时GSI值与CF值存在显著的正相关关系( $r = 0.796, P < 0.05$ ),表明卵巢的发育与亲鱼营养摄入的数量和质量存在密切的联动效应,提示在亲鱼培育促熟过程中加强营养强化是保证性腺良好发育的重要前提。另外,GSI值的变化与光周期调控呈不显著负相关关系( $r = -0.45, P > 0.05$ ),

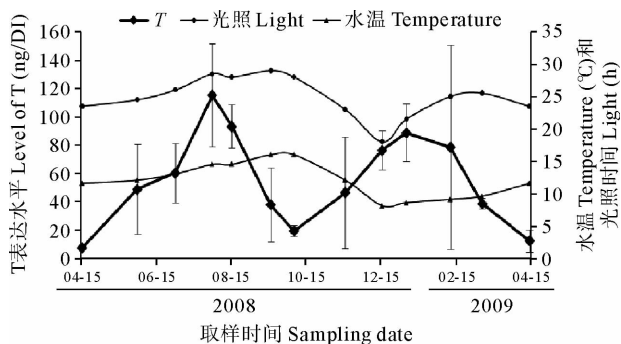


图4 雌鱼血浆中睾酮(T)的周年变化

Fig. 4 Year round variations of plasma testosterone levels

而与水温调控呈显著的负相关关系( $r = -0.707, P < 0.05$ ),表明与光周期相比,水温可能是促进性腺发育的更为重要的环境因子。 $HSI$ 值变化可反映出亲鱼的摄食质量和肝脏能量存储和合成的动态变化。本研究发现,亲鱼 $HSI$ 在卵巢发育至Ⅲ期(11月)时达到峰值,表明在卵黄发生期,鱼体已经储备足够的能量用于供应卵黄蛋白的合成和输送到卵巢,从而促进卵母细胞成熟(Tyler *et al.* 1976)。1~2月, $HSI$ 值下降,表明肝脏储备能量大量用于卵母细胞发育;产卵过程中, $HSI$ 值又有所回升,可能表明肝脏的能量储备处于动态变化过程,与亲鱼多次分批产卵所要求的卵母细胞持续发育所需能量供应相适应。产卵结束后,卵母细胞卵黄积累作用停止,肝脏代谢活动降低, $HSI$ 值随之降低。另外, $HSI$ 值与 $CF$ 值存在显著的正相关关系( $r = 0.731, P < 0.05$ ),表明亲体营养强化和肝脏能量转化间存在密切的关系,因此对于条斑星鲈亲鱼的性腺发育促熟调控,在性腺启动发育开始前和产卵过程中都要加强饵料的投喂和营养强化。在生产实践中观察到,条斑星鲈亲鱼在产卵开始后摄食量下降不明显,这可能是条斑星鲈保证性腺卵母细胞分批发育成熟多次产卵的一种环境适应机制,与本实验得到的 $HSI$ 和 $CF$ 值在产卵期间维持一定的水平相一致。同时, $HSI$ 值的变化与光周期调控呈负相关关系( $r = -0.171, P > 0.05$ ),而与水温调控呈正相关关系( $r = 0.114, P > 0.05$ ); $CF$ 值的变化与光周期和水温调控都呈负相关关系(光周期: $r = -0.373, P > 0.05$ ;水温: $r = -0.373, P > 0.05$ ),这些结果都显示, $HSI$ 值和 $CF$ 值的变化与水温和光周期调控没有直接的密切关联,而主要是与饵料的投喂和营养强化调控有关,这在副眉鲈 *Parophrys vetulus* Girard(Sol *et al.* 1998)、美洲拟庸鲈 *Hippoglossoides platessoides* Fabricius(Maddock *et al.* 1999)和大西洋鳕鱼 *Gadus morhua* L.(Tomkiewicz *et al.* 2003)中有相同的报道。内脏脂肪和肌肉蛋白质是硬骨鱼类生殖能量的主要来源(Ouellet *et al.* 2001)。本研究中 $CF$ 值的变化趋势同 $GSI$ 值,只是峰值出现时间较 $GSI$ 值峰值早30d,体现出条斑星鲈体内储能在生殖期投入和消耗的动态变化,这与其他一些鱼类的研究结果一致(García-López *et al.* 2007)。

### 3.3 性类固醇激素的表达变化规律

鱼类卵巢分泌的性类固醇激素主要包括 $E_2$ 、孕激素和雄激素(T、11-KT、雄烯二酮)等(林浩然等 2007),性类固醇激素的合成和分泌受到外界环境因子和神经内分泌组织-BPG的双重调节(Shimizu 2003),其含量与性腺发育关系密切并呈季节性变化(Modesto *et al.* 2003;Onuma *et al.* 2003)。本研究发现,条斑星鲈卵巢发育过程中,血浆中 $E_2$ 和T的表达水平呈现不同程度的变化。 $E_2$ 在2月(V期,产卵期)达到表达水平峰值,而不是在产卵前期,这与其他比目鱼类的研究结果不同(Methven *et al.* 1992),可能与取样时间有关。有趣的是,在条斑星鲈亲鱼性腺年周期发育过程中, $E_2$ 和T都呈现两个表达峰值, $E_2$ 在前一个峰值(9月)的表达水平低于第2个峰值(2月),而T的表达则呈现相反的规律,这种现象在其他鱼类中较为罕见。血浆雌二醇表达水平类似的变化亦出现在一些生殖季节较长及卵巢多次发育成熟和产卵的鱼类和一些爬行类动物中(Johnson 1998;胡健饶等 2004)。另外,在同为比目鱼类的绿背菱鲈 *Rhombosolea tapirina* Günther的性腺年周期发育过程中也呈现类似性类固醇激素的变化规律(Sun *et al.* 2004)。根据 $E_2$ 和T峰值出现的时间顺序及其与性腺发育阶段的对应关系,作者认为对于 $E_2$ ,第1个峰值出现在9月,正处于性腺发育启动卵黄沉积的关键时期,另外,条斑星鲈卵母细胞直径相对其他鱼类较大, $E_2$ 在此时期的升高可能对于促进卵泡发育和卵黄沉积具有积极的作用,而T在此之前出现峰值可能是在芳香化酶催化下的雌雄性类固醇激素的转换有关(Chang *et al.* 1999)。另外,Kayaba(2005)研究2龄条斑星鲈在人工养殖条件下性类固醇激素的年周期变化,其表达水平变化基本与本研究结果一致,但是2龄条斑星鲈成鱼未呈现两个 $E_2$ 表达水平高峰,这可能意味着性成熟亲鱼的性腺发育成熟规律及其内分泌调控机制方面与未性成熟成鱼存在较大的差异,其可能与性成熟亲鱼为完成生殖产卵功能而对营养摄入、能量转化等过程的适应和转变密切联系,具体的机制尚有待于今后组织细胞化学和分子内分泌学的进一步探讨。

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(Comeau *et al.* 2001)。本研究显示,不同季节血浆中 $E_2$ 的表达水平与 $GSI$ 变化呈现基本一致的变化趋势,但不存在显著相关性,表明 $E_2$ 可能通过其他的通路间接作用调控亲鱼性腺发育成熟。另外,亲鱼血浆中 $E_2$ 表达水平在产卵后期开始明显下降,这可能与诱导卵母细胞最终发育成熟的促成熟激素(MIH,如 $17\alpha, 20\beta$ -双羟孕酮)等



的表达升高密切相关(Mylonas *et al.*, 1997)。本研究中,血浆中 T 含量都早于 E<sub>2</sub>表达水平峰值出现时间,其机理可能与性腺发育过程中 T 在芳香化酶作用下转为 E<sub>2</sub>从而促进性腺持续发育有关(Chang *et al.*, 1999)。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 E<sub>2</sub>的表达水平,这与大西洋鳕鱼 *Gadus morhua* L. 的卵巢发育过程性类固醇激素变化一致(Kjesbu *et al.*, 1991),也有报道称雌鱼性腺发育过程中血浆中 T 和 E<sub>2</sub>表达水平一致(Comeau *et al.*, 2001),关于雌鱼血浆中 T 和 E<sub>2</sub>表达水平的关系,目前尚未有定论。但有报道称,在硬骨鱼类繁殖季节,如果血浆 T 含量低,亲鱼血浆 E<sub>2</sub>/T 的比值的升高可能导致高比例卵巢闭锁现象的发生,进而影响亲鱼繁殖力(Clark *et al.*, 2005)。本研究中,E<sub>2</sub>表达水平变化与 T 表达水平变化呈正相关关系,表明 T 和 E<sub>2</sub>在相互转化方面存在较为密切的关联。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。本研究发现,E<sub>2</sub>与水温的变化关联性不显著( $r=0.065, P>0.05$ ),而与光周期调控存在正相关关系( $r=0.572, P>0.05$ ),而 GSI 值的变化与水温调控存在显著的相关关系( $r=-0.707, P<0.05$ ),此现象可能表明水温和光周期分别通过不同的信号通路调控亲鱼的 BPG 轴的生理功能,其具体的机理尚有待于进一步研究确定。

## 参 考 文 献

- 方永强,林君卓,翁幼竹,刘丽丽. 2004. 池养鳊的卵巢发育和卵子发生过程. 水产学报, 28(4):353~359
- 王妍妍,柳学周,刘新富,陈超,徐永江,翟介明. 2008. 温度、盐度对条斑星鲈胚胎发育的影响. 海洋水产研究, 29(6):27~32
- 王妍妍,柳学周,徐永江,吴莹莹. 2009. 条斑星鲈染色体核型分析. 渔业科学进展, 30(2): 8~13
- 刘筠. 中国养殖鱼类繁殖生理学. 1993. 北京:农业出版社, 29~42, 42~46, 53~55
- 陈文银,张克俭. 2003. 乌鳊卵巢发育的组织学. 水产学报, 27(2):183~186
- 何德奎,陈毅锋,蔡斌. 2001. 纳木错裸鲤性腺发育的组织学研究. 水生生物学报, 25(1):1~13
- 林浩然,刘晓春. 2007. 鱼类生理学实验技术和方法. 广州:广东高等教育出版社, 80
- 尚玉昌. 1993. 普通生态学. 北京:高等教育出版社, 36~37
- 柳学周,徐永江,刘乃真,曲建忠,倪娜,赵明. 2009a. 半滑舌鳎卵巢发育的组织学和形态数量特征研究. 渔业科学进展, 30(6):25~35
- 柳学周,徐永江,刘新富,陈超,王妍妍,马爱军. 2009b. 条斑星鲈(*Verasper moseri*)早期生长发育特征. 海洋与湖泊, 40(6):699~706
- 施腺芳. 1991. 鱼类生理学. 北京:农业出版社, 300~319
- 胡健饶,杜继曾,计翔. 2004. 中国石龙子繁殖季节血浆性类固醇激素水平的变化. 实验生物学报, 37(6):443~448
- Burton, M. P. M., and Idler, D. R. 1984. The reproductive cycle in winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum). Canadian Journal of Zoology, 62:2 563~2 567
- Chang, C. F., Hung, C. Y., and Chiang, M. C. 1999. The concentration of plasma sex steroids and gonadal aromatase during controlled sex differentiation in grey mullet, *Mugil cephalus*. Aquaculture, 177:37~45
- Chopra, H. C. 1958. Cytological and cytochemical study of the growing oocyte of the fish *Boleophthalmus dussumerii*. La Cellule, 60:303~318
- Clark, R. W., Henderson-Arzapalo, A., and Sullivan, C. V. 2005. Disparate effects of constant and annually-cycling daylength and water temperature on reproductive maturation of striped bass (*Morone saxatilis*). Aquaculture, 249:497~513
- Comeau, L. A., Campana, S. E., and Chouinard, G. A. 2001. Timing of Atlantic cod *Gadus morhua* seasonal migrations in relation to serum levels of gonadal and thyroidal hormones. Mar. Ecol. Prog. Ser. 221:245~253
- García-López, Á., Couto, E., and Canario, A. V. M. 2007. Ovarian development and plasma sex steroid levels in cultured female Senegalese sole *Solea senegalensis*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, 146: 342~354
- Higashino, T., Miura, T., Miura, C., and Yamauchi, K. 2002. Histological studies on early oogenesis in barfin flounder (*Verasper moseri*). Zoological Science, 19: 557~563
- Htun-Han, M. 1978. The reproductive biology of the dab *Limanda limanda* (L.) in the North Sea: seasonal changes in the ovary. Journal of Fish Biology, 13: 351~359
- Johnson, A. K. 1998. Seasonal cycles of gonadal development and plasma sex steroid levels in *Epinephelus morio*, a protogynous grouper in the eastern Gulf of Mexico. J. Fish. Biol. 52:502~518
- Kayaba, T., Sugimoto, T., Mori, T., Satoh, N., Adachi, S., and Yamauchi, K. 2003a. Induced spontaneous spawning using an increased temperature stimulus in the cultured barfin flounder *Verasper moseri*. Fisheries Science, 69: 663~669
- Kayaba, T., Sugimoto, T., Adachi, S., and Yamauchi, K. 2003b. Effects of residual over-ripened eggs on egg quality deterioration in barfin flounder *Verasper moseri*. Nippon Suisan Gakkaishi, 69(3):414~416

- Kayaba, T. 2005. Studies on techniques for reliable production of seed of barfin flounder *Verasper moseri*. Sci. Rep. Hokkaido Fish. Exp. Stn. 69:1~116
- Kjesbu, O. S., Klungsøy, J., and Kryvi, H. 1991. Fecundity, atresia, and egg size of captive Atlantic cod (*Gadus morhua*) in relation to proximate body composition. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 48: 2 333~2 343
- Lee, W. K., and Yang, S. W. 2002. Relationship between ovarian development and serum levels of gonadal steroid hormones, and induction of oocyte maturation and ovulation in the cultured female Korean spotted sea bass *Lateolabrax maculatus* (Jeom-nong-eo). Aquaculture, 207:169~183
- Maddock, D. M., and Burton, M. P. M. 1999. Gross and histological observations of ovarian development and related condition changes in American plaice. J. Fish Biol. 53: 928~944
- Merson, R. R., Casey, C. S., and Martinez, C. 2000. Oocyte development in summer flounder: seasonal changes and steroid correlates. J. Fish Biol. 57: 182~196
- Мейен, В. А. К. 1939. вопросу годовом цикле костистых рыб. Цэв. АН СССР. Бюл. 3:389~420
- Methven, D. A., Crim, L. W., and Norberg, B. 1992. Sexual reproduction and plasma levels of sex steroids and vitellogenin in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 49: 754~759
- Micale, V., Maricchiolo, G., and Genovese, L. 1999. The reproductive biology of the amberjack, *Seriola dumerilii* (Risso 1810). I. Oocyte development in captivity. Aquac. Res. 30: 349~355
- Modesto, T., and Canario, A. V. M. 2003. Morphometric changes and sex steroid levels during the annual reproductive cycle of the Lusitanian toadfish, *Halobatrachus didactylus*. General and Comparative Endocrinology, 13:220~231
- Mylonas, C. C., Scott, A. P., and Zohar, Y. 1997. Plasma gonadotropin II, sex steroids, and thyroid hormones in wild striped bass (*Morone saxatilis*) during spermiation and final oocyte maturation. General and Comparative Endocrinology, 108: 223~236
- Onuma, T., Higashi, Y., and Ando, H. 2003. Year-to-year differences in plasma levels of steroid hormones in pre-spawning chum salmon. General and Comparative Endocrinology, 133(2):199~215
- Ouellet, P., Lambert, Y., and Bérubé, I. 2001. Cod egg characteristics and viability in relation to low temperature and maternal nutritional condition. ICES J. Mar. Sci. 58: 672~686
- Rickey, M. H. 1995. Maturity, spawning and seasonal movement of arrowtooth flounder, *Atheresthes stomias*, off Washington. Fish. Bull. 93: 127~138
- Shimizu, A. 2003. Effect of photoperiod and temperature on gonadal activity and plasma steroid levels in a reared strain of the mummichog (*Fundulus heteroclitus*) during different phases of its annual reproductive cycle. General and Comparative Endocrinology, 131:310~324
- Sol, S. Y., Olson, O. P., and Lomax, D. P. 1998. Gonadal development and associated changes in plasma reproductive steroids in English sole, *Pleuronectes vetulus*, from Puget Sound, Washington. Fish. Bull. 96:859~870
- Sun, B., and Pankhurst, N. W. 2004. Patterns of oocyte growth, vitellogenin and gonadal steroid concentrations in greenback flounder. J. Fish Biol. 64(5):1 399~1 412
- Tomkiewicz, J., Tybjerg, L., and Jespersen, Å. 2003. Micro- and macroscopic characteristics to stage gonadal maturation of female Baltic cod. J. Fish Biol. 62: 253~275
- Tyler, A. V., and Dunn, R. S. 1976. Ration, growth, and measures of somatic and organ condition in relation to meal frequency in winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*, with hypotheses regarding population homeostasis. J. Fish. Res. Board Can. 33: 63~75
- Witthames, P. R., and Greer Walker, M. G. 1995. Determinacy of fecundity and atresia in sole (*Solea solea*) from the Channel, the North Sea and the Irish Sea. Aquatic Living Resources, 8:91~109