

温度对半滑舌鳎生长及性类固醇激素水平的影响

汪 娣^{1,2}, 田永胜^{1*}, 齐文山^{1,3}, 温海深⁴, 陈松林¹

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所,农业部海洋渔业可持续发展重点实验室,山东 青岛 266071;

2. 青岛农业大学生命科学学院,山东 青岛 266109;

3. 上海海洋大学水产与生命学院,上海 201306;

4. 中国海洋大学水产学院,山东 青岛 266003)

摘要: 为了探索温度对半滑舌鳎幼鱼生长及性别的影响,本研究以半滑舌鳎家系为材料,在受精后 32 d,将建立的家系鱼苗分别置于 9、21、23、25 和 27 °C 水温下进行培育,在 32~142 dpf 测量各培育温度下半滑舌鳎幼鱼的体长和体质量,利用 SPSS 软件中方差分析和相关分析法多重比较分析幼鱼生长规律、温度与体长和体质量的相关性。结果表明,在 98 dpf 时,25 °C 下幼鱼生长最快,但培养至 129~142 dpf 时,23 °C 温度组生长速度显著高于其他温度组。23 和 25 °C 下的半滑舌鳎体质量特定增长率分别为 4.42% 和 4.63%,明显高于其他温度处理组。温度与半滑舌鳎家系体长、体质量的 Pearson 系数分别为 0.271 和 0.260,极显著正相关。体长、体质量与温度的关系式分别为 $L = 1.6376T^{0.3782}$ ($R^2 = 0.082$), $W = 0.0285T^{1.0781}$ ($R^2 = 0.075$)。采集 23 °C 下半滑舌鳎受精卵和 3~142 dpf 的鱼苗,进行性类固醇激素表达水平分析。结果显示,睾酮(T)和雌二醇(E₂)含量在受精卵中最高(54.78 ng/mg 和 92.52 pg/g),3~32 dpf 时逐渐降至最低值(4.6 ng/mg 和 5.43 pg/g)。至 46 dpf 时又显著上升到峰值[(40.81 ± 12.64) ng/mg 和 (42.04 ± 19.13) pg/g],之后显著下降。在温度控制组,32~46 dpf 各个温度组鱼苗 T 和 E₂ 含量显著上升,46 dpf 时达到峰值,但 19 和 21 °C 温度组显著高于其他组,T 分别为 (94.70 ± 45.06) 和 (85.45 ± 37.30) ng/mg, E₂ 分别为 (83.37 ± 17.97) 和 (105.80 ± 54.90) pg/g;其他温度组 T 和 E₂ 含量相对较低且无显著差异。98 dpf 性类固醇激素表达量显著下降,各温度组 E₂ 水平无显著差异,但 19 和 27 °C 时 T 水平高于其他温度组。依此推测 46 dpf、体长(4.99 ± 0.75) cm 时半滑舌鳎鱼苗性腺开始分化,19 和 27 °C 有可能促使鱼苗雄性化。

关键词: 半滑舌鳎; 温度; 生长; 性类固醇激素

中图分类号: Q 954.55; S 965

文献标志码: A

半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis* Günther, 1873) 属脊索动物门 (Chordata), 硬骨鱼纲 (Osteichthyes), 鲽形目 (Pleuronectiformes), 舌鳎科 (Cynoglossidae), 舌鳎属 (*Cynoglossus*), 是我国近海常见的温水性、底层名贵经济鱼类。经过十多年人工驯化养殖,半滑舌鳎已经成为海水养殖的主要品种。但是半滑舌鳎雌雄个体

生长差异大,雌性个体体质量是雄性个体的 4~6 倍,而且群体中雄鱼比例远高于雌鱼,雄性比率高达 70% 左右,因此,探讨遗传和环境因素对半滑舌鳎性别影响成为目前研究的热点。另外雄性比例高使半滑舌鳎苗种培育和养殖成本极大提高,严重影响了养殖经济效益,限制了这一优良品种的广泛推广。因此如何提高半滑舌鳎

收稿日期:2014-06-10 修回日期:2014-08-10

资助项目:国家自然科学基金(31372510,30972244);山东省泰山学者建设工程专项资助

通信作者:田永胜,E-mail:tianys@ysfri.ac.cn

生长速度和苗种的雌性比例,培育生长快雌性化率高的养殖鱼苗,成为科研和养殖中亟需解决的问题。

许多环境因素和内在生理因素直接影响鱼类性别分化和生长。在环境因素中,温度在鱼类繁殖和生长中具有重要作用^[1]。例如,温度能够促进大西洋鳕(*Gadus morhua*)^[2]、欧洲鲈(*Dicentrarchus labrax*)^[3]、青鳉(*Pollachius pollachius*)^[4]和虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[5]等鱼类的个体生长和性腺分化,在此过程中性类固醇激素 17 β -雌二醇(E₂)和睾酮(T)在性腺分化中具有重要的作用,因此研究温度与性类固醇激素的关系及变化规律,是解析温度对半滑舌鲷性别影响的途径之一。在此方面国内外对美洲拟鲈(*Pseudopleuronectes americanus*)^[6]、European plaice (*Pleuronectes platessa*)^[7]、English sole (*Parophrys vetulus*)^[8]、漠斑牙鲈(*Paralichthys dentatus*)^[9]、greenback flounder (*Rhombosolea tapirina*)^[10]和青鳉(*Oryzias latipes*)等鱼类血浆性类固醇激素的时空表达水平,以及性腺发育过程中性类固醇激素随温度变化的规律等进行了研究^[11]。但是温度对半滑舌鲷发育过程中性类固醇激素表达水平影响研究还未见报道。

本实验以半滑舌鲷家系为材料,检测不同温度下半滑舌鲷家系生长和性类固醇激素含量的变化,研究温度与生长、性类固醇激素水平表达之间的作用关系,以及温度对半滑舌鲷性别的影响,以期对半滑舌鲷性别控制提供理论和技术依据。

1 材料与方法

1.1 半滑舌鲷家系的建立和培育

利用山东省海阳市黄海水产有限公司培育的健康半滑舌鲷雌雄亲鱼,经过生殖调控达到性成熟,采用挤压腹部法采集 1 尾雌鱼成熟卵 500 mL 于 1 000 mL 的烧杯中,利用吸管采集 1 尾雄鱼精液 1 mL 加入卵中,摇动烧杯使卵精混合,加入 300 mL、22 ℃海水激活受精,受精 10 min 后利用过滤网冲洗受精卵数次,加入清水在烧杯中沉淀,使受精卵与死卵分离,将上浮卵放入 50 cm × 50 cm × 100 cm 网箱孵化,24 h 后收集上浮卵 200 mL,分别放入 3 个 3 m³水缸中继续孵化,并

利用空气泵向水中充气增氧,水温保持 19.6 ~ 22.4 ℃。受精后 36 h 孵化出膜,进行鱼苗培育饲养。孵化时水温控制在 24 ℃以内。依据鱼苗生长和食性变化,从鱼苗开口、食性转化、伏底,先后分别用轮虫、卤虫幼体、卤虫成体和日清牌人工配合饵料 B1、B2、C1、C2、S1、S2、EP1、EP2 进行饲喂。

1.2 温度调控

受精后 32 d (32 dpf, days post fertilization), 鱼体长达到 15.0 ~ 20.0 mm, 开始对家系鱼苗人工控温培育,分别在 5 个 3 m³水缸中放入 2 000 尾鱼苗,并分别将培育水温调节至 19、21、23、25、27 ℃(温度浮动 ± 1 ℃),利用 1 000 W 加热棒和电脑智能温度控制器(WK-SM3,深圳安晟电子科技有限公司)控制水温,另外配备 3 个 3 m³水缸将水温加热到 25 ~ 27 ℃,每天 3 次对培育缸进行水体交换,每次交换 2/3 水体,以保证培育水温稳定、水质清澈,并持续利用充气泵给培育缸中充氧。在以上条件下培育至 106 d,之后将水温控制在 19 ~ 20 ℃饲养。水体 pH 7.52 ~ 7.65,盐度为 23.3 ~ 25.0。

1.3 测量和取样

生长测量 在受精后 32、46、82、98、129、142 d 分别对每个温度梯度下培育的鱼苗进行随机取样并测量体长和体质量,每一实验组分别取 40 ~ 70 尾样本测量其体长和体质量。

自然养殖温度下鱼苗性类固醇测量样本采集 在自然养殖温度下(23 ℃)培育半滑舌鲷受精卵和鱼苗,在受精后 1 d 时,取 1 g 卵,受精后 3、5、8、10、25、32、46、98、129、142 d 时分别采集半滑舌鲷鱼苗,每次取 10 尾,利用 2 mL 冷冻管保存于液氮中,运回实验室进行性类固醇含量测定。

温度控制鱼苗性类固醇测定样本采集 在受精后 32、46、98 d 时,分别采集 19、21、23、25、27 ℃温度处理组的半滑舌鲷组织样本,每组取样 10 尾,利用 2 mL 冷冻管保存于液氮中,运回实验室进行性类固醇含量测定。

1.4 性类固醇激素含量测定

从卵和鱼体中提取性类固醇激素,方法参照 Sun 等^[12]和 Rougeot 等^[13],并略有改动。半滑舌鲷全鱼苗用蒸馏水洗净,置于研钵中,然后加入 50% 乙醇(W:V = 1:1),充分研磨,之后将匀浆液转入 15 mL 离心管中,无水乙醇(1 ~ 2 mL)冲洗

研钵,将清洗液倒入离心管,继续研磨;4℃下 $6\,000 \times g$ 离心 10 min,取上清液至离心管中,沉淀物加 1~2 mL 无水乙醇,研磨,4℃下 $6\,000 \times g$ 离心 10 min,汇集上清液至离心管;加入 5 倍体积的二氯甲烷萃取,通风橱静置分层,将水相移至另一离心管,重复上步操作 2 次,汇集有机相,通风橱内挥发有机相;及时去除水膜,如果水膜较厚,可以加入等体积的二氯甲烷萃取;待有机相完全挥发后,用适量 0.01 mol/L (含 1% BSA) PBS + 乙醇缓冲液室温下充分吹打溶解,将溶液储存于 -20℃ 待用。

采用双抗体放射免疫测定法 (RIA),并适当进行修改来测定 E_2 和 T 的表达含量。碘 [^{125}I] 雌二醇和碘 [^{125}I] 睾酮放射免疫试剂盒由天津九鼎生物有限公司生产。用 0 标准液将试剂盒中 10 ng/dL (T) 和 10 pg/mL (E_2) 稀释到 1 ng/dL 和 1 pg/mL,作为最低浓度的标准物。然后采用半微量 (^{125}I 标记物、标准品浓度、抗体、分离剂加半量) 法测定,双管平行加样,采用 60 s 计数,所得结果除以 2,同时得到 B/B0%,以标准管的 B/B0% 为 y 轴 (B 为每对试管计算率的均值, B0 为 0 标准双管计算率的均值),标准物浓度为 x 轴,绘制出标准曲线,采用 4 参数 Logistic 拟合模型计算出各样本管的 T 和 E_2 的浓度 (T: ng/dL; E_2 : pg/mL)。

1.5 数据处理

利用 $SGR_w = 100 \times (\ln W_2 - \ln W_1)/t$, (W_2 指末重, W_1 指始重, t 指实验日数), $SGR_L = 100 \times (\ln L_2 - \ln L_1)/t$, (L_2 指末长, L_1 指始长, t 指实验日数) 计算实验期间的特定生长率 (Ricker, 1979; Jones, 2002), 并利用 Excel 统计软件作图。

利用 98 dpf 测得的生长数据,分析 19~27℃ 范围内,温度与半滑舌鲷鱼苗体长、体质量的相关性,并分别建立体长与温度、体质量与温度的乘幂关系 $L = aT^b$ 、 $W = aT^b$, 计算决定系数 R^2 值。

根据公式计算出单位质量样品中目标激素的含量。计算公式:

$$X = Y/(M/V)$$

式中, X 为单位质量样品中目标激素的含量 (T: ng/mg; E_2 : pg/g), Y 为单位浓度样本抽提液中目标激素的含量 (T: ng/dL; E_2 : pg/mL), M : 抽提样本质量 (g), V 为每个样本抽提总体积 (mL)。

利用 SPSS 软件进行方差分析,实验数据为

平均值 $\pm$ 标准差 (mean $\pm$ SD)。同时利用 Student-Newman-Keuls (SNK) 法对获得的数据进行多重比较分析,分别在 $P=0.05$ 或 0.01 水平上分析其差异性,比较结果用字母标记法,在同一系列中字母相同表示差异不显著 ($P>0.05$),字母不同表示差异显著 ($P<0.05$) 或极显著 ($P<0.01$)。

2 结果

2.1 半滑舌鲷家系的生长情况

随着温度的升高,半滑舌鲷幼鱼的体长和体质量均呈现先升高后降低的趋势 (图 1)。受精后 98 d 时,在 19~27℃ 培育条件下,温度与半滑舌鲷家系体长、体质量的 Pearson 系数分别为 0.271 和 0.260,体长和体质量的相关系数为 0.889,都达到极显著正相关 ($P<0.01$)。同时,根据生长数据拟合了体长、体质量与温度的关系式: $L = 1.637\,6T^{0.378\,2}$ ($R^2 = 0.082$), $W = 0.028\,5T^{1.078\,1}$ ($R^2 = 0.075$), 式中, $b < 3$, 表示在此温度范围内随着温度的升高,半滑舌鲷鱼苗的体长和体质量也相应快速增长 (表 1)。

在受精后 46 d 时,19、21、23、25、27℃ 处理组半滑舌鲷的体长和体质量分别达到 (1.76 ± 0.47) cm, 0.046 g; (1.86 ± 0.51) cm, 0.07 g; (2.20 ± 0.29) cm, 0.11 g; (2.12 ± 0.47) cm, 0.073 g 和 (1.90 ± 0.47) cm, 0.056 g。其中 23 和 25℃ 处理组生长较快,与其他温度组具有显著性差异 ($P<0.05$)。受精后 82 d, 21、23 和 25℃ 处理组半滑舌鲷体长和体质量分别为 (4.73 ± 0.64) cm, (0.58 ± 0.26) g; (4.69 ± 0.54) cm, (0.55 ± 0.17) g 和 (4.59 ± 0.68) cm, (0.55 ± 0.23) g, 明显高于其他温度处理组 ($P<0.05$), 但相互之间没有明显差异 ($P>0.05$)。受精后 98 d, 25℃ 处理组的半滑舌鲷的体长和体质量分别达到 (5.97 ± 0.95) cm, (1.22 ± 0.49) g, 其生长明显快于其他温度处理组 ($P<0.05$)。受精后 129 d, 21、23 和 25℃ 处理组的半滑舌鲷的体长和体质量分别达到 (8.97 ± 1.56) cm, (3.74 ± 1.60) g; (9.20 ± 1.40) cm, (4.17 ± 1.66) g 和 (8.94 ± 1.55) cm, (3.85 ± 1.73) g, 明显高于 19 和 27℃ 处理组 ($P<0.05$)。受精后 142 d, 23℃ 处理组的半滑舌鲷生长明显优于其他处理组 ($P<0.05$), 其体长和体质量已分别达到

(13.22 ± 1.63) cm, (12.01 ± 4.12) g。在受精后 142 d 取样时,因 27 °C 处理组的半滑舌鳎死亡过多,达不到取样数目(图 1)。

在 19 ~ 25 °C 范围内,半滑舌鳎幼鱼体长和体质量特定生长率随着温度的升高而增大,在 27 °C 下特定生长率有所降低。其中,23 和 25 °C 下的半滑舌鳎体质量特定生长率明显高于其他温度处理组 ($P < 0.05$),分别为 4.42% 和 4.63%,相互之间无明显差异 ($P > 0.05$)。在 25 °C 下,体长特定生长率 (2.76%) 最高,其次是 23 °C 处理组 (2.65%),在 19、21 和 27 °C 下显著降低,但相互之间无显著差异 ($P > 0.05$) (图 2)。

表 1 温度与半滑舌鳎家系体长、体质量相关分析
Tab.1 Correlations between temperature and body size (body length and weight) in half-smooth tongue sole

		温度/°C	体长/cm	体质量/g
		temperature	length	weight
温度/°C	Pearson correlation	1	0.271 **	0.260 **
	Sig. (2-tailed)	.	0.000	0.000
体长/cm	Pearson correlation	0.271 **	1	0.889 **
	Sig. (2-tailed)	0.000	.	0.000
体质量/g	Pearson correlation	0.260 **	0.889 **	1
	Sig. (2-tailed)	0.000	0.000	.

注: ** 表示在 $P = 0.01$ 水平上具有极显著性差异
Notes: ** means correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed)

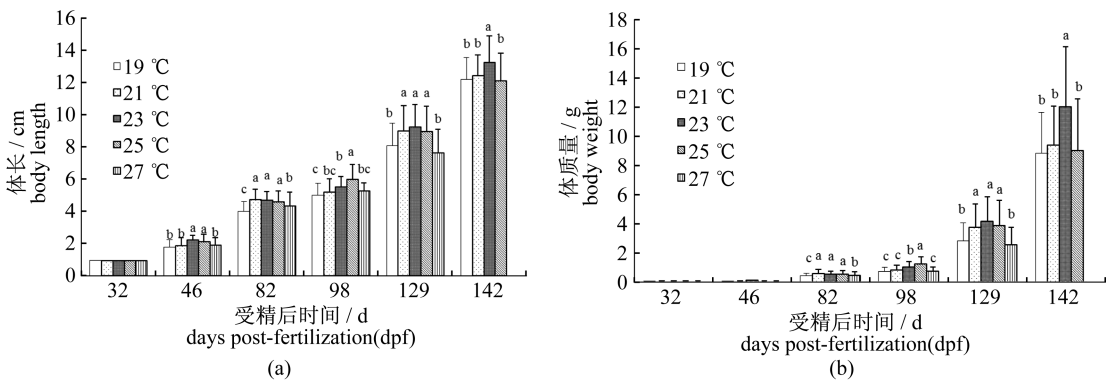


图 1 在不同时期不同温度下的半滑舌鳎生长体长 (a) 和体质量 (b)
不同温度处理组之间字母 (a, b, c) 不同表示有显著的差异 ($P < 0.05$)。以下注释同此
Fig.1 Changes in total length (a) and weight (b) relative to the 5 constant temperatures tested in the half-smooth tongue sole
The letters (a, b, c) indicate significant differences between temperature groups ($P < 0.05$), the same as the following

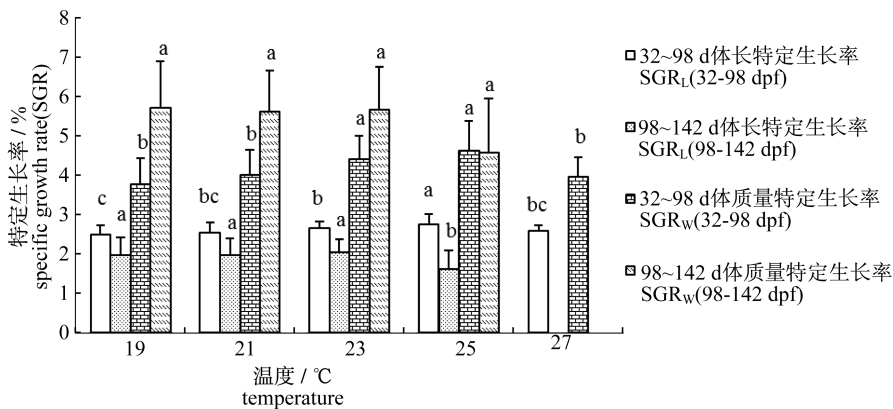


图 2 不同温度下半滑舌鳎的特定生长率 (SGR)
SGR_L:表示体长特定生长率; SGR_w:表示体质量特定生长率; 32 ~ 98 dpf, 98 ~ 142 dpf:分别表示受精后时间段
Fig.2 Specific growth rate (SGR_L and SGR_w) of half-smooth tongue sole at different temperatures during the 32 – 98 dpf and 98 – 142 dpf periods
SGR_L means specific growth rate of body length; SGR_w means specific growth rate of body weight; 32 – 98, 98 – 142 dpf mean time period after fertilization, respectively

2.2 自然养殖条件下半滑舌鲷鱼苗性类固醇激素水平

自然养殖温度(22~23℃)条件下,半滑舌鲷受精后1d的卵中性类固醇激素含量相当高,T和E₂含量分别为54.78 ng/mg和92.52 pg/g。孵化后鱼苗中性类固醇水平随着鱼苗的生长逐渐降低,受精后3d T和E₂分别为5.62 ng/mg和87.24 pg/g;受精后5d T和E₂分别为19.33 ng/mg和34.30 pg/g;受精后8d T和E₂分别为8.21 ng/mg和31.68 pg/g;受精后10d,E₂含量仅13.07 pg/g,T为7.36 ng/mg;受精后25d,T含量仅为4.68 ng/mg,E₂含量为9.85 pg/g。至受精后32d,E₂和T的水平降到最低,含量分别为5.43 pg/g和4.6 ng/mg。之后随着鱼苗的生长,在受精后32~46d性类固醇激素水平又显著上升,在46d达到又一个高峰,T和E₂含量分别为(40.81±12.64)ng/mg和(42.04±19.13)pg/g。之后性类固醇激素水平又显著下降,受精后142d,分别下降到4.52 ng/mg和11.13 pg/g(图3)。

2.3 温度控制条件下半滑舌鲷鱼苗性类固醇激素水平

受精后32d将半滑舌鲷鱼苗分置在19、21、23、25和27℃5个养殖温度下进行温度控制,此时半滑舌鲷体内性类固醇激素表达水平极低。受精后46d时,各个温度组的性类固醇表达量均急剧升高到较高水平,但19和21℃组性类固醇激素含量相对于其他温度组较高,19℃组T和

E₂含量分别为(94.70±45.06)ng/mg和(83.37±17.97)pg/g;21℃组T和E₂含量分别为(85.45±37.30)ng/mg和(105.80±54.90)pg/g。23、25和27℃条件下的性类固醇含量无显著差异($P>0.05$),T表达范围为(40.81±12.64)~(46.74±18.73)ng/mg;E₂表达范围为(42.04±19.13)~(53.08±19.38)pg/g。受精后98d,结束温控,T含量在19和27℃处理组中分别为25.15和38.65 ng/mg,高于21、23和25℃处理组($P<0.05$)(图4-a)。E₂在各个温度处理组含量较46dpf时大幅降低,且各温度处理组无明显差异($P>0.05$),表达量为(13.02±5.31)~(15.52±3.64)ng/mg(图4-b)。

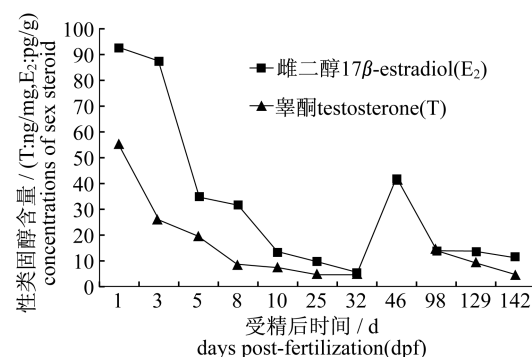


图3 自然养殖温度(22~23℃)下半滑舌鲷鱼苗在1~142 dpf体内性类固醇激素(雌二醇和睾酮)含量变化规律

Fig.3 Concentration of estradiol-17 β and testosterone in eggs and larvae in 1~142 dpf by natural breeding temperature(22~23℃) of half-smooth tongue sole

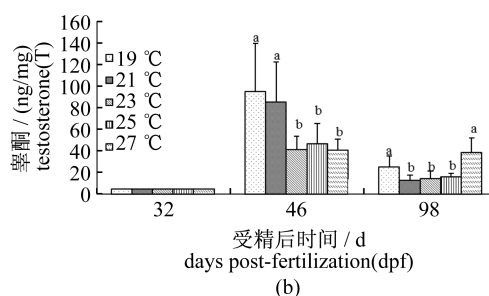
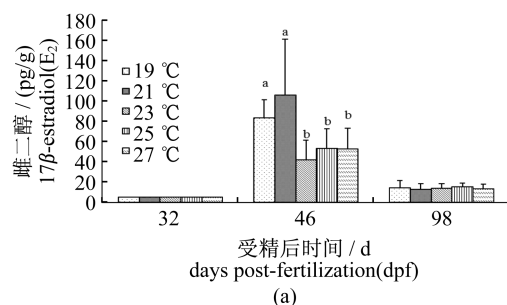


图4 不同时期不同温度处理下半滑舌鲷体内性类固醇激素雌二醇(a)和睾酮(b)表达水平

Fig.4 Changes of the level of testosterone(a) and estradiol-17 β (b) in relation to the 5 constant temperatures tested of the half-smooth tongue sole during larval and juvenile development stage

3 讨论

对于鱼类养殖而言,适宜的水温能促进生长、

减少病害、维持生理平衡、保障品质和提高经济效益。在高温条件下,半滑舌鲷易发生病变,如白化、烂尾等,鱼苗摄食量差,饵料转化时易发生死

亡;在低温下,鱼苗摄食量大大减少,生长缓慢。鱼的种类不同,其对温度的适应能力也不同。通过调节温度来促进鱼类生长是最有效的途径之一。在 13、25 和 29 °C 条件下的欧洲鲈的日增重率分别为 0.45%、1.29% 和 1.21%。在适宜生长的温度范围(13 ~ 25 °C)内,欧洲鲈的生长速度随着温度的升高而加快,而一旦超过这一范围,其生长速度降低^[14]。大菱鲈(*Scophthalmus maximus*)的适宜生长温度范围为 16 ~ 20 °C,在(15.2 ± 0.6) ~ 24 °C 内,随着温度的升高,大菱鲈幼鱼的生长率逐渐降低,且死亡率逐渐升高^[15]。

目前对半滑舌鲷适宜生长温度的研究结果存在一定的差异,根据以往报道的半滑舌鲷幼鱼适宜生长水温范围有 14 ~ 25 °C^[16]、18 ~ 25 °C^[17] 和 20 ~ 26 °C^[18] 等研究结果。在 19 ~ 25 °C 条件下的半滑舌鲷鱼苗生长率相对较高,但在 16 和 28 °C 时生长率略有下降^[17]。在 17.5 ~ 27.5 °C 的实验范围内,随着温度的升高,半滑舌鲷幼鱼的生长率呈现先升高后降低的趋势,在 27.5 °C 时明显下降^[18]。本研究结果显示,在 20 ~ 25 °C 温度范围内,幼苗体长和体质量特定生长率随着温度的升高而增大,而 19 °C 处理组半滑舌鲷幼苗生长缓慢,27 °C 处理组特定生长率明显减小,综上所述,半滑舌鲷鱼苗适宜生长温度应当在 17 ~ 27 °C,低于或高于这一温度范围都不利于鱼苗生长。在适宜温度范围内,温度与半滑舌鲷幼鱼的体长和体质量呈显著正相关($P < 0.01$),体长、体质量与温度的函数关系也验证了这一结果。可见适当提高培育水温可以提高半滑舌鲷幼鱼生长速度,23 ~ 25 °C 更适合半滑舌鲷鱼苗的早期生长。

Imsland 等^[19] 将大菱鲈鱼苗的培育水温从 20 °C 逐渐降低到 16 °C,结果表明先高温后低温的调控模式能促进大菱鲈鱼苗的后期生长。本研究的生长数据显示,温度控制实验结束时经 25 °C 控温培育的半滑舌鲷鱼苗生长最好。温控结束后,在 129 dpf 时,21 和 23 °C 处理组生长与 25 °C 组无明显差异,但在 142 dpf 时,23 °C 处理组的鱼苗生长较快。实验结果与 Imsland 的研究相似,早期适宜高温处理同样有利于促进半滑舌鲷鱼苗的生长。

温度不仅对鱼类生长具有明显的影响,同时也能够影响鱼类性类固醇激素的表达水平,进而对性别分化产生影响。在鲤(*Cyprinus carpio*)

中,仅仅改变 5 °C 就能使雌二醇的分泌量变化 20 倍^[20]。温度升高或降低能够导致牙鲈雄性化的发生^[21-22];高温能使罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)雄性化,推断可能因温度升高导致芳香化酶 mRNA 表达降低,进而使雌二醇表达量减小,发生雄性化,但在罗非鱼中添加了芳香化酶抑制剂后产生了相反的结果^[23]。在杂交鲟和施氏鲟(*Acipenser schrenckii*)生殖周期中,雄鱼睾酮的含量随着精子发生而逐渐升高,且这种高含量的睾酮一直持续到精巢成熟;雌鱼睾酮含量在卵黄期开始显著升高^[24]。在斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)中,性类固醇激素水平与温度密切相关,当水温上升至 17.5 ~ 22.4 °C 时,雌二醇含量显著上升,而睾酮含量仅略有升高;其后雌二醇含量随着温度的升高而增至(20.4 ± 2.07) pg/mL,睾酮含量也随后升高到(36 ± 4.4) μg/mL^[25]。圆斑星鲈(*Verasper variegatus*)养殖群体性腺指数与温度的相关指数为 -0.783,雌二醇和睾酮的含量均与水温呈显著负相关^[26]。

在自然养殖水温下(23 °C)半滑舌鲷仔鱼体内的睾酮和雌二醇含量在 3 ~ 32 dpf 呈下降趋势,46 dpf 时含量达最高峰,而根据性腺组织切片观察的结果,此时正是半滑舌鲷卵巢分化时期^[27],睾酮和雌二醇浓度也较高,表明睾酮和雌二醇的大量分泌与半滑舌鲷性别分化密切相关。这与 Rougeot 等^[13]报道的欧亚鲈(*Perca fluviatilis*)在组织学性别分化发生时,性类固醇激素显著升高的结论一致。在温度控制下 46 dpf 时,各温度组类固醇激素表达水平均明显上升,但 19 和 21 °C 处理组的半滑舌鲷鱼苗类固醇表达水平高于其他组,说明此时 19 ~ 21 °C 组半滑舌鲷鱼苗性腺分化正处于旺盛时期。98 dpf 时,类固醇水平表达量显著降低,但 19 和 27 °C 温度组睾酮水平略高于其他温度组,而雌二醇水平无显著差异,此时半滑舌鲷卵巢已经发育至 I 期^[27],依据以上结果可以推测 19 和 27 °C 有促进半滑舌鲷雄性化的可能。

本实验中半滑舌鲷受精卵 1 dpf 时性类固醇激素表达量非常高,至 32 dpf 时,睾酮和雌二醇含量降至仅 4.6 ng/mg 和 5.43 pg/g。Rougeot 等^[13]报道的欧亚鲈未受精的卵中也检测出了浓度非常高的雌二醇和睾酮,推测这些性类固醇激素可能是从母本中转移过来的。成熟的雌性罗非鱼卵中也包含着高浓度的睾酮和雌二醇,而在 1 d

到 3 周龄的罗非鱼中,雌二醇和睾酮含量呈锐减的趋势,在第 3 周时,睾酮含量小于 0.04 ng/尾,雌二醇含量小于 0.012 pg/尾^[28]。

在硬骨鱼中,卵巢的发育依赖于内源性雌二醇,卵巢产生的雌二醇能引导雌性生殖细胞中的 DNA 合成,进而促进卵母细胞的发育和成熟,睾酮则被认为是雌二醇的前体,在性别分化和性腺发育过程中表达量一直较高^[29]。在大西洋鳕的雌性性腺发育过程中,睾酮的表达量一直低于雌二醇的表达量,也有报道称大西洋鳕卵巢发育过程中 T 与 E₂ 表达水平一致^[30-32]。徐永江等^[26]报道的半滑舌鲷雌性个体中血浆睾酮的表达水平一直低于雌二醇的表达水平,在卵巢发育过程中 T 和 E₂ 变化一致。本研究中,雌二醇含量一直高于睾酮的含量,但二者的变化趋势基本一致,在性腺分化时其含量显著升高。

综上所述,半滑舌鲷鱼苗在培育温度为 23 ~ 25 °C 时生长最快,在适宜温度范围内提高温度可促进半滑舌鲷鱼苗的生长。在半滑舌鲷受精卵中类固醇含量最高,随着鱼苗孵化和发育,类固醇含量逐渐降低,但当鱼苗生长到 46 dpf,体长大于 (4.99 ± 0.75) cm,体内类固醇水平显著增加并达到峰值,之后又逐渐下降。19 ~ 21 °C 能够促进类固醇激素含量整体升高。但鱼苗发育到 98 d 时,19 和 27 °C 促进了睾酮水平提高,而 17β-雌二醇在各处理组无显著差异。因此可以推论,46 dpf 时半滑舌鲷鱼苗开始性别分化,98 dpf 时性别分化已经完成,19 和 27 °C 可能会促使鱼苗雄性化。

参考文献:

- [1] Baroiller J F, Guiguen Y, Fostier A. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 1999, 55 (6-7): 910-931.
- [2] Brander K M. The effects of temperature on growth of the Atlantic cod (*Gadus morhua*) [J]. ICES Journal of Marine Science, 1995, 52(1): 1-10.
- [3] Blázquez M, Zanuy S, Carillo M, et al. Effects of rearing temperature on sex differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) [J]. Journal of Experimental Zoology, 1998, 281(3): 207-216.
- [4] Person-Le Ruyet J, Buchet V, Vincent B, et al. Effects of temperature on the growth of Pollack (*Pollachius pollachius*) juveniles [J]. Aquaculture, 2006, 251(2-4): 340-345.
- [5] Nykänen M. Effects of temperature and feeding regime on compensatory growth of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [D]. University of Jyväskylä, Faculty of Science, Master of Science Thesis, 2006.
- [6] Harmin S A, Crim L W, Weigand M D. Plasma sex steroid profiles and the seasonal reproductive cycle in male and female winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum) [J]. Marine Biology, 1995, 121(4): 601-610.
- [7] Scott A P, Witthames 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]. Journal of Fish Biology, 1998, 52(1): 128-145.
- [8] Johnson L L, Casillas E, Myers M S, et al. Patterns of oocyte development and related changes in plasma 17β-estradiol, Vitellogenin, and plasma chemistry in English sole *Parophrys vetulus* Girard [J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 1991, 152: 161-185.
- [9] Merson R R, Casey C S, Martinez C, et al. Oocyte development in summer flounder; seasonal changes and steroid correlates [J]. Journal of Fish Biology, 2000, 57(1): 182-196.
- [10] Sun B, Pankhurst N W. Patterns of oocyte growth, vitellogenin and gonadal steroid concentrations in greenback flounder [J]. Journal Fish Biology, 2004, 64(5): 1399-1412.
- [11] Nagahama Y. Molecular mechanisms of sex determination and gonadal sex differentiation in fish [J]. Fish Physiology Biochemistry, 2005, 31(2-3): 105-109.
- [12] Sun P, You F, Liu M X, et al. Steroid sex hormone dynamics during estradiol-17β induced gonadal differentiation in *Paralichthys olivaceus* (Teleostei) [J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2010, 28(2): 254-259.
- [13] Rougeot C, Krim A, Mandiki S N M, et al. Sex steroid dynamics during embryogenesis and sexual differentiation in Eurasian perch, *Perca fluviatilis* [J]. Theriogenology, 2007, 67(5): 1046-1052.
- [14] Ruyet J P L, Mahé K, Bayon N L, et al. Effects of temperature on growth and metabolism in a Mediterranean population of European sea bass, *Dicentrarchus labrax* [J]. Aquaculture, 2004, 237(1-4): 269-280.

- [15] Imsland A K, Sunde L M, Folkvord A, *et al.* The interaction between temperature and size on growth of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* Rafinesque) [J]. Journal Fish Biology, 1996, 49: 926 – 940.
- [16] Wang X Q, Gu X Z, Yan B L, *et al.* Studies on biology and culture ecology of cynoglossus semilaevis [J]. Fisheries Economy Research, 2006 (4): 15 – 17. [王兴强, 顾夕章, 阎斌伦, 等. 半滑舌鳎生物学及其养殖生态研究. 渔业经济研究, 2006 (4): 15 – 17.]
- [17] Fang J H, Tian X L, Dong S L, *et al.* Effects temperature on the growth, biochemical composition and energy budget of tongue sole, *Cynoglossus semilaevis* Günther [J]. Periodical of Ocean University of China, 2010, 40(1): 25 – 30. [房景辉, 田相利, 董双林, 等. 温度对半滑舌鳎的生长、生化组成和能量收支的影响. 中国海洋大学学报, 2010, 40(1): 25 – 30.]
- [18] Tian Y S, Wang D, Xu Y, *et al.* Effects of rearing temperature on growth and sex determination in the half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35 (2): 176 – 183. [田永胜, 汪娣, 徐营, 等. 温度对半滑舌鳎家系生长及性别的影响. 水产学报, 2011, 35 (2): 176 – 183.]
- [19] Imsland A K, Schram E, Roth B, *et al.* Improving growth in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* Rafinesque) by rearing fish in switched temperature regimes [J]. Aquaculture International, 2007, 15 (5): 403 – 407.
- [20] Manning N J, Kime DE. Temperature regulation of ovarian steroid production in the common carp, *Cyprinus carpio* L., *in vivo* and *in vitro* [J]. General and Comparative Endocrinology, 1984, 56 (3): 376 – 388.
- [21] Ospina-A'lvarez N, Piferrer F. Temperature-dependent sex determination in fish revisited: prevalence, a single sex ratio response pattern, and possible effects of climate change [J]. PLoS One, 2008, 3(7): e2837.
- [22] Kitano T, Takamune K, Kobayashi T, *et al.* Suppression of P450 aromatase gene expression in sex-reversed males produced by rearing genetically female larvae at a high water temperature during a period of sex differentiation in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Journal of Molecular Endocrinology, 1999, 23(2): 167 – 176.
- [23] D'Cotta H, Fostier A, Guiguen Y, *et al.* Aromatase plays a key role during normal and temperature-induced sex differentiation of tilapia *Oreochromis niloticus* [J]. Molecular Reproduction and Development, 2001, 59(3): 265 – 276.
- [24] Zhang L Z, Zhang T, Zhuang P, *et al.* Changes in sex steroid concentration of in different sex and gonad development of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*) [J]. Journal of Fudan University: Natural Science, 2011, 50(3): 360 – 365. [章龙珍, 张涛, 庄平, 等. 不同性别和性腺发育阶段施氏鲟血清性类固醇激素含量变化. 复旦科学: 自然科学版, 2011, 50(3): 360 – 365.]
- [25] Zhao H H, Liu X C, Liufu Y Z, *et al.* Seasonal cycles of ovarian development and serum sex steroid levels of female grouper *Epinephelus coioides* [J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2003, 42(6): 56 – 63. [赵会宏, 刘晓春, 刘付永忠, 等. 斜带石斑鱼雌鱼卵巢发育与血清性类固醇激素的生殖周期变化. 中山大学学报: 自然科学版, 2003, 42(6): 56 – 63.]
- [26] Xu Y J, Liu X Z, Wang Q Y, *et al.* Annual gonadal maturation cycle of captive spotted halibut, *Verasper variegatus*; correlation with serum sex steroids and photothermal regulation. Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(4): 836 – 846. [徐永江, 柳学周, 王清印, 等. 养殖圆斑星鲽血浆性类固醇激素表达与卵巢发育及温光调控的关系. 中国水产科学, 2011, 18(4): 836 – 846.]
- [27] Wang D, Tian Y S, Chen S L, *et al.* Effect of water temperature on gonadal development in half-smooth tongue-sole (*Cynoglossus semilaevis* Günther) [J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(2): 262 – 271. [汪娣, 田永胜, 陈松林. 温度对半滑舌鳎性腺发育影响. 水产学报, 2012, 36(2): 262 – 271.]
- [28] Rothbard S, Moav B, Yaron Z. Changes in steroid concentrations during sexual ontogenesis in Tilapia [J]. Aquaculture, 1987, 61(1): 59 – 74.
- [29] Higashino T, Miura T, Miura C, *et al.* Effects of two sex steroid hormones on early oogenesis in Japanese huchen (*Hucho perryi*) [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2003, 28(1–4): 343 – 344.
- [30] Rnsson B J B, Steinarsson A, Rnason T. Growth model for Atlantic cod (*Gadus morhua*): Effects of temperature and body weight on growth rate [J]. Aquaculture, 2007, 271(1–4): 216 – 226.
- [31] 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]. Marine Ecology Progress Series, 2001, 221: 245 – 253.
- [32] Kjesbu O S, Klungsøyr J, Kryvi H, *et al.* Fecundity, atresia, and egg size of captive Atlantic cod (*Gadus morhua*) in relation to proximate body composition [J]. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 1991, 48: 2333 – 2343.

Effect of temperature on the growth and sex steroid concentration of the half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)

WANG Di^{1,2}, TIAN Yongsheng^{1*}, QI Wenshan^{1,3}, WEN Haishen⁴, CHEN Songlin¹

(1. Key Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Shandong Qingdao 266071, China;

2. College of Life Sciences and Technology, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China;

3. College of Aqua-life and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

4. Fisheries College, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: The influence of temperature on growth and the expression levels of sex steroids were studied in juvenile half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis* Günther, 1873). Tongue soles at 32 days post-fertilization (dpf) were exposed to temperatures ranging from 19 to 27 °C. Measurements of length and body weight of all individuals in each temperature group were conducted 32 – 142 dpf. Student-Newman-Keuls software was used to analyze the growth rhythm of juveniles and relativity of temperature and length and body weight of half-smooth tongue sole. Results showed that the juveniles of 98 dpf grew fastest in 25 °C group but grew fastest in 23 °C group when cultured between 129 – 142 dpf. The specific growth rates of body weight of half-smooth tongue sole were 4.42 and 4.6 respectively at 23 and 25 °C and obviously higher than other temperature groups. The Pearson correlation coefficients between temperature and total length and body weight were 0.271 and 0.260, respectively. Moreover, the relationships of temperature (T) and length (L) and body weight (W) were given by the equations $L = 1.6376T^{0.3782}$ ($R^2 = 0.082$) and $W = 0.0285T^{1.0781}$ ($R^2 = 0.075$), respectively. The expression of sex steroid hormones in fertilized egg and juveniles of 3 – 142 dpf at 23 °C were detected. The results showed that the concentrations of testosterone (T) and 17 β -estradiol (E₂) were very high in fertilized eggs, but decreased gradually and reached their lowest levels at 32 dpf (4.6 ng/mg for T and 5.43 pg/g for E₂) and then increased to their highest levels (average 40.80 – 94.70 ng/mg for T and 42.04 – 105.80 pg/g for E₂) at 46 dpf, but decreased again later. In all temperature groups, the concentrations of T and E₂ increased obviously at 32 – 46 dpf and reached highest levels at 46 dpf. The concentrations of T and E₂ in 19 and 21 °C groups were much higher than that in other groups and there were no significant differences in these groups. The concentrations of sex steroid hormones decreased significantly at 98 dpf in all temperature groups and the expression of E₂ had no significant differences, but the expression of T were higher in 19 and 27 °C groups than that in other groups. Therefore, it was speculated that the gonad of juvenile half-smooth tongue sole began to differentiate when the body length was (4.99 ± 0.75) cm at 4 dpf and 19 and 27 °C may be the temperature which could promote the juvenile to masculinization.

Key words: *Cynoglossus semilaevis*; temperature; growth; sex steroid

Corresponding author: TIAN Yongsheng. E-mail: tianys@ysfri.ac.cn