

# 虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)选育群体的 血清类固醇激素周年变化\*

谷 伟<sup>1</sup> 徐革锋<sup>1,2</sup> 户 国<sup>1</sup> 张永泉<sup>1</sup> 王炳谦<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所 哈尔滨 150070; 2. 东北农业大学动物科技学院水产系 哈尔滨 150030)

**提要** 采用放射性免疫(RIA)和组织学切片技术,系统地研究了虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)选育群体的血清性类固醇激素周年变化与性腺发育特点的关系,以及血清中性类固醇激素雌二醇(E<sub>2</sub>)和睾酮(T)在雌雄亲本中的周年变化规律和生理作用。结果表明,虹鳟性腺发育可划分为 6 期。雌鱼血清中 E<sub>2</sub> 在 10 月(V 期性腺)达到峰值, T 浓度在 11 月达到峰值,而进入繁殖期后(11—12 月) E<sub>2</sub> 开始下降。雄鱼血清 T 浓度在 11 月达到最大值, E<sub>2</sub> 在 6 月份达到峰值,在 11 月之后 T 开始下降。在各月份,雌鱼 E<sub>2</sub> 浓度水平远高于雄鱼,而雄鱼 T 浓度个别月份低于雌鱼。这些研究揭示出,测定血清性类固醇激素浓度水平可用于准确判断鱼类的生殖状态,且可为虹鳟家系选育出早熟亲本群体提供重要技术依据。

**关键词** 虹鳟; 选育群体; 血清; 类固醇激素; 周年变化

**中图分类号** S917

很多学者认为,鱼类是通过脑—垂体—性腺(BPG)轴对性类固醇激素和生长因子的调控促进配子发生和性腺成熟(Merson *et al.*, 2000; 徐永江等, 2011)。在卵生硬骨鱼类中,性腺生成类固醇激素的能力和种类与性腺发育周期密切相关(李志杰等, 2011),鱼类性腺所分泌的性类固醇激素主要包括雌二醇(E<sub>2</sub>)、睾酮(T)和孕酮等,其中 E<sub>2</sub> 的主要作用是诱发肝脏合成卵黄蛋白原,促进卵巢发育(Kishida *et al.*, 1992);而 T 是精巢成熟的主要调控激素,与配子发生及成熟排放有关(Cochran, 2005)。因此,对鱼类性类固醇激素的测定可为评价鱼类 BPG 轴生理功能和生殖状态提供重要信息。

虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)是世界水产养殖业中高品质鱼类之一。目前,国内外学者对虹鳟人工养殖(刘孝华, 2007)、生长(王炳谦等, 2007a)、血液(何福林等, 2007; 韩英等, 2007)、生化(庞艳红等, 2007)、遗传育种(Takashi *et al.*, 1999; 王炳谦等, 2007b, 2009)、营养免疫(徐奇友等, 2008; 李婵等, 2008)等方面进行

了大量深入的研究工作。基于我国一些生产单位利用近几年引进的虹鳟进行繁育,由于不了解这些群体的遗传背景,生产的苗种具有相当程度的风险,最大的可能是由遗传分离导致生长速度的差异较大,生产水平急剧降低。因此,大力开展虹鳟优良品系的选育是我国现阶段虹鳟养殖业中亟待完成的科研项目。

开展对虹鳟的优良品种选育工作,是合理利用并保护虹鳟优良品质的主要方式。现有的虹鳟可繁殖群体存在成熟不同步问题,造成繁殖期过于漫长,对雄鱼的使用也过于频繁。因此,本研究通过对虹鳟选育群体亲本的血清类固醇激素进行周年测定,掌握其性激素的变化状况,以期为外源性性激素诱导和有目的的选育早熟品种提供基础技术资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验鱼

优质虹鳟来源于黑龙江水产研究所渤海冷水性鱼类试验站家系选育群体,3 龄,体长(54.65±3.42)cm,

\* 国家科技支撑项目, 2012BAD26B03-07 号; 公益性行业(农业)科研专项经费, 201003055 号; 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项, 201008 号。谷 伟, 助理研究员, E-mail: guweineau@126.com

通讯作者: 王炳谦, 研究员, E-mail: wbqfish@yahoo.com.cn

收稿日期: 2012-03-17, 收修改稿日期: 2012-05-31

体质量为(2275±323.55)g。

### 1.2 饲喂及饲养管理条件

虹鳟雌雄亲本同池饲养,摄食鲑鳟鱼亲鱼专用饲料,每天投喂2次,日投喂量为体重的1%—2%。全年水温变幅为4—18℃,每周清理池底污物3次。

### 1.3 血样采集

血液采集参徐革锋等(2012)的方法,用0.5mL/L苯氧乙醇水溶液对虹鳟进行麻醉,用10mL注射器从尾静脉采血,每尾取血量不少于5mL。血样在4℃冰箱中静置4—5h,然后以6000r/min的速度离心15min,分离出血清,血清注入采样管中,标上日期及雌雄(均为电子标记个体),测试前血清保存在超低温冰箱中,全部样品集中一次测定性类固醇激素含量。每月进行一次血样采集,每次采集雌雄鱼各10尾。

### 1.4 组织切片和性腺分期

性腺样品经过 Bouin's 液固定,常规乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋。通过 KD1508 型切片机横、纵向连续切片(厚 5μm),之后经 H.E 染色,中性树胶封片。制备好的切片通过 Carl Zeiss MicroImaging GmbH 3708 自动数码显微摄影系统观察和拍照,并通过 Motic3.2 图像采集系统进行图像处理,性腺发育期的划分按照刘筠(1993)的标准,从而进行性腺分期。

### 1.5 性类固醇激素的测量方法

采用放射免疫测定方法(RIA)测定,测定血清中的雌二醇(E<sub>2</sub>)、睾酮(T)浓度。分析试剂盒购自潍坊三维生物工程集团有限公司。

### 1.6 数据分析

通过 SPSS 16.0 分析软件对实验数据进行单因素方差分析,当 P<0.05 时为差异性显著,各实验所得数据表示为平均值±标准误。

## 2 结果与分析

### 2.1 虹鳟的性腺发育分期

研究表明,家系选育群体的产卵期为每年的10—12月份,性腺处于V期;翌年1—3月份为性腺恢复期,性腺处于VI期;3—9月份为性细胞发生期,性腺历经II

期、III期和IV期;9—10月为性腺成熟期。

### 2.2 虹鳟血清 E<sub>2</sub> 和 T 含量的周年变化规律

虹鳟的雌性亲本的血清 E<sub>2</sub> 峰值区间出现在 9—10 月份;10—12 月份为产卵期,因此 E<sub>2</sub> 处于下降趋势;至翌年 4 月份血清 E<sub>2</sub> 的含量达到最低值,该时期为卵巢退化期;此后 4—9 月份 E<sub>2</sub> 的含量不断增加,为卵巢再次成熟期(图 1)。而雌性亲本的血清 T 的峰值出现在 11 月份,最低含量出现在翌年的 2—3 月份,4—9 月份含量变化不明显(图 1)。

虹鳟的雄性亲本的血清 E<sub>2</sub> 峰值出现在 6 月份,6—12 月份其含量呈下降趋势;翌年 1—6 月间 E<sub>2</sub> 呈现不断上升趋势,含量的最低值出现在每年的 1—4 月份和 12 月份(图 2)。而雄性亲本的血清 T 的峰值出现在 11 月份,极低值出现在翌年的 3—8 月份(图 2)。

### 2.3 虹鳟雌雄亲本 E<sub>2</sub> 含量变化比较

在虹鳟性腺的成熟周期,不同月份雌雄亲本的血清 E<sub>2</sub> 含量存在不同程度差异(表 1),除 4 月份外,

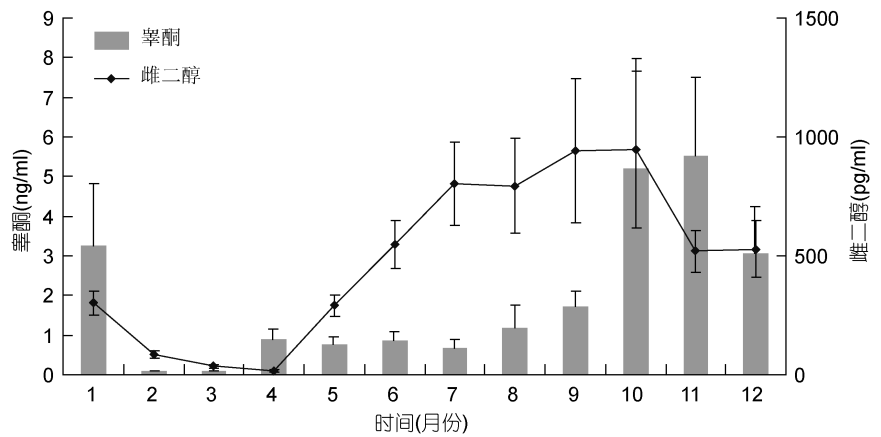


图 1 虹鳟雌性亲本血清类固醇激素周年变化规律

Fig.1 The seasonal changes of serum steroid levels in female parent of rainbow trout

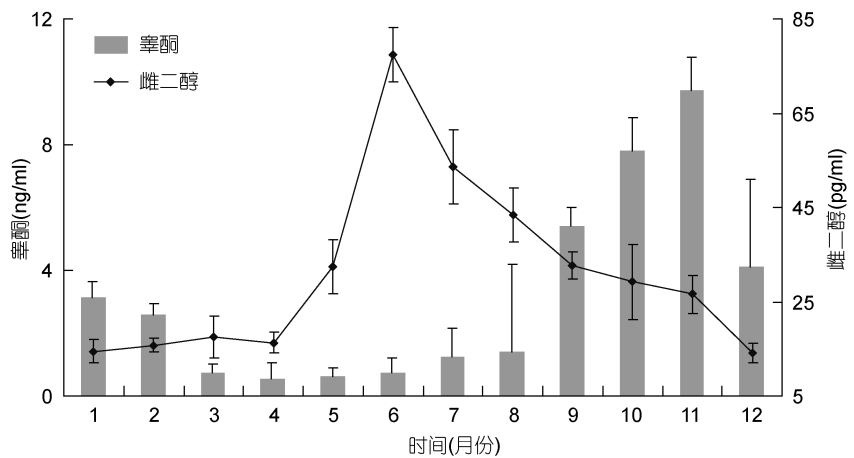


图 2 虹鳟雄性亲本血清类固醇激素周年变化规律

Fig.2 The seasonal changes of serum steroid levels in male parent of rainbow trout

表 1 不同月份虹鳟早熟选育群体雌雄亲本 E<sub>2</sub> 含量比较Tab.1 Comparison of E<sub>2</sub> level between female and male parent of early-maturing population in different months

月份	1	2	3	4	5	6
雌性(ng/mL)	302.96±50.50 <sup>a</sup>	82.80±15.87 <sup>a</sup>	35.65±7.87 <sup>a</sup>	16.61±4.50	291.26±45.78 <sup>a</sup>	546.66±100.15 <sup>a</sup>
雄性(ng/mL)	14.49±2.50 <sup>b</sup>	15.82±1.50 <sup>b</sup>	17.51±4.50 <sup>b</sup>	16.36±2.15	32.51±5.78 <sup>b</sup>	77.37±5.75 <sup>b</sup>
月份	7	8	9	10	11	12
雌性(ng/mL)	803.37±175.87 <sup>a</sup>	794.64±198.86 <sup>a</sup>	941.52±300.67 <sup>a</sup>	946.07±300.54 <sup>a</sup>	520.97±87.75 <sup>a</sup>	529.23±120.23 <sup>a</sup>
雄性(ng/mL)	53.58±7.86 <sup>b</sup>	43.43±5.78 <sup>b</sup>	32.71±2.87 <sup>b</sup>	29.21±7.98 <sup>b</sup>	26.59±4.13 <sup>b</sup>	14.15±1.98 <sup>b</sup>

注: 同一列中不同角标表示差异显著( $P < 0.05$ )

其余月份雌雄亲本的 E<sub>2</sub> 含量值存在显著性差异( $P < 0.05$ )。早熟群体的产卵期在 11—12 月份, 雄性成熟较早, 一般在 10 月份。雌性亲本血清 E<sub>2</sub> 的最高浓度出现在 10 月份, 为(946.07±330.54)ng/mL, 11—12 月份 E<sub>2</sub> 开始显著下降到 520.97—529.23ng/mL, 此时雌性亲本开始产卵, 进入产卵期。而雄性血清 E<sub>2</sub> 的浓度极大值出现在 6 月份, 为(53.58±7.86)ng/mL, 随后月份开始下降, 到 12 月份达到最低浓度, 此时为雄鱼的集中成熟期。

#### 2.4 虹鳟雌雄亲本 T 含量的变化比较

在虹鳟性腺的成熟周期, 不同月份雌雄亲本的血清 T 含量存在不同程度差异(表 2), 雌雄亲本血清 T 浓度的极大值均出现在 11 月份, 分别为(5.51±1.98)ng/mL 和(9.72±1.08)ng/mL, 但雄性显著高于雌性( $P < 0.05$ )。雄性血清 T 值在 9—11 月份较高, 雌性的在 10—11 月份。在性腺一个成熟周期之后的翌年 1 月份, 雌雄亲本的血清 T 浓度无显著性差异( $P > 0.05$ ), 之后的 3—8 月份, 雌雄亲本的血清 T 浓度均处于较低浓度。

### 3 讨论

硬骨鱼类的 E<sub>2</sub> 和 T 是调节鱼类的生殖过程的主要性类固醇激素。鱼类性类固醇激素水平在非生殖季

节普遍较低, 进入生殖季节, 随着配子形成雌鱼的 E<sub>2</sub> 和 T(雄鱼的 T)血清浓度也随之逐渐增高, 性腺成熟之后显著下降, 虽然 E<sub>2</sub> 是雌鱼的主要性类固醇激素, 然而最近的研究发现, E<sub>2</sub> 在正常雄鱼繁殖中也是必不可少的(Fostier *et al.*, 1983; Hess, 2003)。本研究报道了我国重要商业养殖鱼类——虹鳟的性腺周年期发育过程中的血清性类固醇激素的表达变化规律, 为该鱼的人工培育、家系群体选育和生殖调控提供了重要的技术资料。

#### 3.1 虹鳟性腺发育特征

虹鳟个体发育成熟后, 与其他鲑科鱼类一样仅含有精巢或卵巢, 属于雌雄异体鱼类。其性腺与其他硬骨鱼类的形态和结构类似, 即性腺成对, 左右两侧对称, 位于体腔的鳔与消化道之间, 末端开口汇合于共同的输卵管或输精管(徐革锋, 2006)<sup>1)</sup>。

#### 3.2 血清性类固醇激素浓度周年变化与卵巢发育特征的关系

在性细胞发生期(3—9 月份), 雌鱼血清中雌激素含量的升高主要是 E<sub>2</sub>, 它诱导肝脏合成卵黄蛋白原, 这与沈卓坤等(2007)对双棘黄姑鱼的研究相一致; 但在该时期雄鱼血清中 E<sub>2</sub> 浓度也不断升高, 到 6 月份达到峰值, 之后不断降低。在这时期, E<sub>2</sub> 对脑垂体 GnH 的分泌起负反馈作用, 表现在性细胞成熟后期, 特别

表 2 不同月份虹鳟早熟选育群体雌雄亲本 T 含量比较

Tab.2 Comparison of T level between female and male parent of early-maturing population in different months

月份	1	2	3	4	5	6
雌性(ng/mL)	3.25±1.57	0.089±0.017 <sup>a</sup>	0.082±0.019 <sup>a</sup>	0.89±0.25 <sup>a</sup>	0.77±0.19 <sup>a</sup>	0.88±0.20 <sup>a</sup>
雄性(ng/mL)	3.15±0.50	2.60±0.33 <sup>b</sup>	0.76±0.28 <sup>b</sup>	0.56±0.48 <sup>b</sup>	0.65±0.26 <sup>b</sup>	0.76±0.48 <sup>b</sup>
月份	7	8	9	10	11	12
雌性(ng/mL)	0.68±0.20 <sup>a</sup>	1.18±0.58 <sup>a</sup>	1.71±0.39 <sup>a</sup>	5.19±2.78 <sup>a</sup>	5.51±1.98 <sup>a</sup>	3.06±1.19 <sup>a</sup>
雄性(ng/mL)	1.25±0.91 <sup>b</sup>	1.43±2.75 <sup>b</sup>	5.43±0.57 <sup>b</sup>	7.82±1.05 <sup>b</sup>	9.72±1.08 <sup>b</sup>	4.11±2.79 <sup>b</sup>

注: 同一列中不同角标表示差异显著( $P < 0.05$ )

1) 徐革锋, 2006. 细鳞鱼卵巢发育性腺分化卵子发生. 哈尔滨: 东北农业大学硕士学位论文, 1—56

是在雌性亲本产卵期, 血液中  $E_2$  明显下降。本研究发  
发现, 虹鳟血清  $E_2$  浓度水平在性腺 II 期开始升高, 于  
期(精巢到 III 期)达到峰值, 一直到繁殖期结束前  $E_2$   
浓度逐渐降低, 验证了  $E_2$  在促进性细胞成熟方面具  
有重要生理功能, 这与徐永江等(2011)对半滑舌鲷的  
性类固醇激素的研究结果相一致。雄鱼血清中  $E_2$  浓  
度明显低于雌鱼, 且周年变化不明显, 因为  $E_2$  主要  
是诱导肝脏合成卵黄蛋白原, 而在精巢发育过程中  
作用不大。虹鳟雌性亲本的血清 T 浓度在配子成熟期  
急剧上升, T 浓度变化曲线紧跟在雌二醇变化之后,  
并在配子成熟时(性腺为 V 期)达到最高值, 即繁殖季  
节, 对于早熟选育群体而言为每年的 10—12 月份。

### 3.3 $E_2$ 和 T 在雌雄亲本性腺发育过程中的作用

虹鳟雌鱼的 T 含量在 1、11、12 月份非常高, 这  
与林浩然等(2006)所描述的 T 是  $E_2$  的前体, 有时在血  
液中 T 浓度比雄鱼还要高些(1 月份), 特别是雌鱼卵  
黄生成末期达到最高(10 月份), 也证明了卵子的发育  
和成熟必须在较高水平的 T 作用下才能完成的观点。  
雄鱼 T 的变化同精巢的发育基本一致, 在精巢发育的  
一期(10—11 月份), T 维持在较高浓度水平(5.19—  
5.51 ng/mL)。这与赤鲟和黄鲢的变化趋势相同(Kokokiris  
*et al.*, 1999; 周定刚等, 1995)。Aida(1983)早已证明, T  
作为 11-酮基睾酮合成的中间产物而存在, 而 11-酮基  
睾酮和 T 具有促进精子形成和排精的作用, T 具有调  
节精子细胞分化的作用。丁汉波等(1987)认为, 精子  
的最后成熟必须有较高水平的 T 作用才能完成。雄鱼  
在精子发生的形成期, 血清中 T 水平大幅度升高, 这  
种升高与精子细胞的出现是一致的。

### 参 考 文 献

- 丁汉波, 全允栩, 1987. 发育生物学. 北京: 高等教育出版社, 45—65
- 王炳谦, 谷 伟, 贾钟贺等, 2007a. 4 个品系虹鳟生产性能的比较. 大连水产学院学报, 22(3): 170—174
- 王炳谦, 谷 伟, 贾钟贺等, 2007b. 虹鳟不同养殖群体杂交  $F_1$  及其自繁系生产性能的比较. 淡水渔业, 37(2): 65—69
- 王炳谦, 谷 伟, 高会江等, 2009. 利用配合力和微卫星标记预测虹鳟品系间的杂交优势. 中国水产科学, 16(2): 206—213
- 刘 筠, 1993. 中国养殖鱼类繁殖生理学. 北京: 中国农业出版社, 20—30
- 刘孝华, 2007. 虹鳟鱼的生物学特性及人工养殖技术. 江苏农业科学, 1: 135—137
- 李 婵, 徐奇友, 许 红等, 2008. 几种饲料添加剂对虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) 免疫活性和抗氧化能力的影响. 安徽农业大学学报, 35(3): 456—461
- 李志杰, 洪万树, 连惠波等, 2011. 中华乌塘鳢雌雄异体和雌雄同性类固醇激素含量的季节变化与差异. 台湾海峡, 30(3): 369—374
- 何福林, 向建国, 李常健等, 2007. 水温对虹鳟血液学指标影响的初步研究. 水生生物学报, 31(3): 363—368
- 沈卓坤, 郑剑辉, 陈怀定, 2007. 双棘黄姑鱼血清性类固醇激素的周年变化. 广东海洋大学学报, 27(3): 16—19
- 林浩然, 彭 纯, 梁坚勇等, 2006. 鱼类生理学实验技术和方法. 广州: 广东高等教育出版社, 88—94
- 周定刚, 郑维明, 张大祥, 1995. 催产时黄鳍鲷性类固醇激素含量变化的研究. 水生生物学报, 19(2): 312—316
- 庞艳红, 孙中武, 尹洪滨等, 2007. 5 个虹鳟群体的生化遗传分析. 水产学报, 31(4): 539—544
- 徐永江, 柳学周, 王清印等, 2011. 半滑舌鲷 (*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. 海洋与湖沼, 42(1): 67—74
- 徐奇友, 李 婵, 许 红等, 2008. 茶多酚对虹鳟生长性能、生化指标和非特异性免疫指标的影响. 动物营养学报, 20(5): 547—553
- 徐革锋, 牟振波, 尹家胜, 2012. 细鳞鲑 (*Brachymystax lenok*) 与哲罗鲑 (*Hucho taimen*) 的血液学比较研究. 海洋与湖沼, 43(1): 100—105
- 韩 英, 王 琨, 张澜澜等, 2007. 二倍体与三倍体虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 红细胞及部分血液指标的比较. 淡水渔业, 37(6): 52—55
- Aida K, 1983. Effect of LH-releasing hormone on gonadal development in salmonid fish Ayu. Bull Jpn Soc Sci Fish, 49: 711—718
- Cochran R C, 2005. *In vivo* and *in vitro* evidence for the role of hormones in fish spermatogenesis. Journal of Experimental Zoology, 261(2): 143—150
- Fostier A, Jalabert B, Billard R *et al.*, 1983. The Gonadal Steroids. In: Hoar W S, Randall D J, Donaldson E D ed. Fish Physiology. Orlando: Academic, 277—372
- Hess R A, 2003. Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. Reproductive Biology Endocrinology, 1(1): 52
- Kishida M, Anderson T R, Specker J L, 1992. Induction by 17- $\beta$ -estradiol of vitellogenin in striped bass (*Morone saxatilis*): characterization and quantification in plasma and mucus. General and Comparative Endocrinology, 88: 29—39
- Kokokiris L, Brusle S, Kentouri M *et al.*, 1999. Sexual maturity and hermaphroditism of the red porgy *Pagrus pagrus* (Teleostei: Sparidae). Mar Biol, 134: 621—629
- Merson R R, Casey C S, Martinez C *et al.*, 2000. Oocyte development in summer flounder: seasonal changes and steroid correlates. Journal of Fish Biology, 57: 182—196
- Takashi S, Roy G, Nobuaki O *et al.*, 1999. Linkage analysis of quantitative trait loci associated with spawning time in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 173: 33—43

## SEASONAL CHANGES OF SERUM STEROID LEVELS IN RAINBOW TROUT (*ONCORHYNCHUS MYKISS*) OF THE SELECTION POPULATION

GU Wei<sup>1</sup>, XU Ge-Feng<sup>1,2</sup>, HU Guo<sup>1</sup>, ZHANG Yong-Quan<sup>1</sup>, WANG Bing-Qian<sup>1</sup>

(1. Heilongjiang River Fisheries Research Institute of Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin, 150070;

2. College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin, 150030)

**Abstract** Aiming to finding the relationship between seasonal changes of serum steroid levels and developmental stages of gonad, and investigation the seasonal cycles of serum testosterone (T) and estradiol (E<sub>2</sub>) levels, we measured rainbow trout of the selection population using RIA and histology slice technique methods in this study. Our results showed that the development of gonad in rainbow trout included VI stages. The females had one E<sub>2</sub> peak value in October (in the V stage), and the T level in females changed follow with that of E<sub>2</sub> and reached the highest value in November. However, E<sub>2</sub> level was decreased just in the spawning season. The males had one T peak value in November and one E<sub>2</sub> peak value in June. Nevertheless, T level was decreased after high-peak stage. The E<sub>2</sub> level in females was always higher than males obviously in annual cycle. However, T level in males was lower than females in some months. Together, these findings showed that the levels of serum steroid had relationship with gonad development, which offered us the technology support to the selection of the early-maturing population in rainbow trout.

**Key words** Rainbow trout; Selective population; Serum, Steroid levels; Seasonal changes