

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20201215001

http://www.yykyjz.cn/

李冰玉, 温海深, 王灵钰, 李金库, 齐鑫, 李昀. 花鲈性腺分化组织学及性别相关基因 *cyp11b* 和 *cyp19a1a* 的表达分析. 渔业科学进展, 2021, 42(6): 185-193

LI B Y, WEN H S, WANG L Y, LI J K, QI X, LI Y. Histology of gonadal differentiation and expression analysis of sex-related genes *cyp11b* and *cyp19a1a* in spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*). Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(6): 185-193

花鲈性腺分化组织学及性别相关基因 *cyp11b* 和 *cyp19a1a* 的表达分析*

李冰玉 温海深 王灵钰 李金库 齐鑫 李昀^①

(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 以花鲈(*Lateolabrax maculatus*) 1~214 dph (day post hatching)的仔稚鱼、幼鱼以及18月龄的雌鱼和雄鱼为研究对象,研究了花鲈早期性腺发生、发育和分化情况;分析了性腺分化过程中性别相关基因(*cyp11b* 和 *cyp19a1a*)的表达及与性别之间的关系。结果显示,在30 dph [全长为(1.28±0.10) cm],首次在中肾管前端的腹腔膜周围观察到原始生殖细胞(primordial germ cells, PGCs),说明30 dph前是花鲈胚后 PGCs 迁移至生殖嵴的关键时期;在55 dph [全长为(2.45±0.19) cm],观察到一对呈对称分布的原始性腺已经形成,说明花鲈幼鱼的原始性腺在30~55 dph (全长为1.28~2.45 cm)之间发生;55~180 dph时(全长为2.45~12.28 cm),原始性腺不断发育变大,并且一直处于未分化状态;180 dph后性腺开始分化;在195 dph [全长(14.54±1.54) cm]观察到精巢开始分化,卵巢于205 dph [全长为(15.86±0.94) cm]开始分化,且性腺的解剖学分化要早于细胞学分化;18月龄的花鲈幼鱼性腺发育到Ⅱ期。性别分化相关基因 *cyp19a1a* 在花鲈卵巢中的表达量高于同期精巢,说明其在卵巢的分化及维持中发挥更关键的作用,而 *cyp11b* 在18月龄幼鱼Ⅱ期精巢中的表达量显著高于同时期的卵巢及Ⅰ期精巢,说明其主要在精巢的分化及维持中扮演重要角色。本研究结果不仅可以丰富花鲈的繁殖生理学资料,也为其性别调控技术的研究提供了科学依据。

关键词 花鲈; 性别分化; 组织学; *cyp11b*; *cyp19a1a*

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)06-0185-09

原始生殖细胞(primordial germ cells, PGCs)作为鱼类生殖细胞系的祖先,在胚胎发育的早期阶段从体细胞中分化出来(宋卉等, 2004)。在组织学上,PGCs 呈现体积大、圆形或椭圆形、具有一个大且明亮的圆形细胞核、细胞质为嗜酸性等生物学特征(游秀容, 2012)。在胚胎发育过程中,PGCs 按照特定的迁移路线到达生殖嵴的位置,与周围体细胞共同发育形成原

始性腺,即未分化的性腺。在硬骨鱼类中,雌雄异体是最常见的性腺分化类型,具有双向分化潜力的未分化性腺直接发育为卵巢或精巢,此后性别保持终身不变(杨阳, 2018)。

鱼类作为低等脊椎动物,具有多种性别决定方式,主要为基因型性别决定、环境型性别决定和基因-环境相互作用型性别决定(Strüssmann *et al*, 2002)。随

* 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系资助 [This work was supported by China Agriculture Research System of MOF and MARA]. 李冰玉, E-mail: 1032566031@qq.com

① 通讯作者: 李昀, 副教授, E-mail: yunli0116@ouc.edu.cn

收稿日期: 2020-12-15, 收修改稿日期: 2021-01-08

着分子生物技术的快速发展,鱼类性别决定基因或相关基因也被不断鉴定,主要有 *Dmrt1*、*Sox9*、*Foxl2*、*Amh* 以及芳香化酶基因等(李云航等, 2011; 路畅等, 2014; 文爱韵等, 2008)。性别相关基因又可进一步分为精巢分化相关基因和卵巢分化相关基因。其中,性腺芳香化酶基因 *cyp19a1a* 通常在卵巢分化过程中呈高表达,因为 *cyp19a1a* 编码的性腺芳香化酶可将雄激素转化为雌激素,从而促进卵巢分化(Kishida *et al.*, 2001; Kobayashi *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2010; Si *et al.*, 2016)。而其旁系同源基因 *cyp11b* 则属于精巢分化相关基因, *cyp11b* 编码的 11 β -羟化酶可促进雄激素的合成,从而阻碍卵巢的分化,导致精巢分化(Blázquez *et al.*, 2009; Driscoll *et al.*, 2020)。

花鲈(*Lateolabrax maculatus*)又称中国花鲈,俗称海鲈、七星鲈、鲈板、寨花等(温海深等, 2019),隶属鲈形目(Perciformes)、鲈科(Serranidae)、花鲈属(*Lateolabrax*) (成庆泰等, 1987)。与大多数硬骨鱼类的性腺分化方式相同,花鲈为雌雄异体型,当体长达到 60 cm 左右时性腺成熟,雄性一般 2~3 龄性成熟,而雌性 3~4 龄性成熟(韩枫, 2016; 温海深等, 2019)。孙帼英等(1994)对长江口及浙江沿海的花鲈卵巢发育等繁殖生物学进行了研究。迟美丽(2015)对花鲈精巢发育周期进行了组织学鉴定,并测定了繁殖周期内相关基因的表达情况。韩枫(2016)对花鲈亲鱼性腺系数周年变化及性腺成熟度分期做了详细分析。目前,国内学者对花鲈早期性腺的形成及分化方面的研究尚未见报道。因此,本研究以花鲈的仔稚鱼和幼鱼为研究对象,自受精卵孵化之日起,对花鲈性腺的发生、发育及分化进行追踪,以确定原始性腺发生及性别分化时间;并测定了性别相关基因 *cyp11b* 和 *cyp19a1a* 在性别分化初期的精巢和卵巢中的表达情况,旨在丰富花鲈的繁殖生理学资料,也为其性别调控技术的研究提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

2019 年 10—11 月在山东省东营市利津县双赢水产苗种有限责任公司,对来自黄渤海的花鲈亲鱼群体进行人工催产及人工授精,获取同批次受精卵,受精卵孵化后的花鲈仔稚鱼培育参考温海深等(2019)的方法进行。培养条件:水温为 15℃~20℃,盐度为 28~30, pH 为 7.5~8.0,溶解氧>5.0 mg/L,总氨氮<1.0 mg/L。

1.2 样品采集

自初孵仔鱼开始,每隔 10 d 左右取样 1 次,每

次随机选取 20 尾鱼。取样时,先用适量 MS-222 (200 mg/L)麻醉,测量全长及体长。当全长<2 cm 时,全鱼固定于波恩氏液中;当全长为 2~10 cm 时,取含性腺的躯干部分固定;当全长>10 cm,性腺可以单独剥离时,取其中一部分性腺用波恩氏液固定,另一部分置于液氮中快速冷冻, -80℃ 保存,用于 RNA 提取。

1.3 石蜡组织切片

含性腺的组织经波恩氏液固定 24 h 后,经 70%~100%梯度乙醇脱水(70%乙醇 40 min, 80%乙醇 40 min, 95%乙醇 35 min \times 2, 100%乙醇 25 min \times 2),二甲苯透明(1/2 乙醇 + 1/2 二甲苯混合液 15 min,二甲苯 15 min \times 2),浸蜡(石蜡 20 min \times 3),石蜡包埋,然后连续切片为 5~7 μ m 的组织片,经苏木精-伊红(HE)染色,中性树脂封片后镜检观察。

1.4 总 RNA 提取及 cDNA 合成

使用 Trizol 法提取性腺总 RNA,并利用核酸测定仪(OSTC, 中国)检测提取后的 OD 值及 RNA 浓度。同时进行 1.5%琼脂糖凝胶电泳,检测 RNA 的完整性。将 RNA 浓度调至 500 ng/ μ L,使用反转录试剂盒 [HiScript[®] III RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)] (诺唯赞, 中国)反转录为 cDNA,反应体系和反应条件:(1)去除基因组 DNA:总 RNA 1 μ L, 4 \times gDNA wiper Mix 4 μ L, RNase-free ddH₂O 加至 16 μ L,在 42℃ 反应 2 min;(2)反转录:上述反应产物 16 μ L, 5 \times HiScript III qRT SuperMix 4 μ L, 37℃ 反应 15 min 后, 85℃ 反应 5 s。

1.5 实时荧光定量 PCR

cyp11b (MN685653)和 *cyp19a1a* (MN685656)基因序列来源于 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。利用 Primer Premier 5 软件设计引物,并由华大基因 Oligo 合成,所用引物序列见表 1。使用 ChamQ[™] SYBR[®] qPCR Master Mix (High ROX Premixed)试剂盒(诺唯赞, 中国), StepOnePlus[™] Real-Time PCR 系统(Applied Biosystems, 美国)进行实时荧光定量 PCR (RT-qPCR), 20 μ L 反应体系: 2 μ L cDNA, 10 μ L ChamQ[™] SYBR Color qPCR Master Mix, 上下游引物各 0.4 μ L, 7.2 μ L ddH₂O。qPCR 扩增反应条件: 95℃ 预变性 30 s; 95℃ 10 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s, 40 个循环。RT-qPCR 实验均包括 4 个生物学重复和 3 个技术学重复。以 18S 作为花鲈内参基因(Wang *et al.*, 2018), 使用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 方法进行数据计算, 采用 SPSS 21.0 统计软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA), 当 $P < 0.05$ 时为差异显著。

表 1 qPCR 特异性引物
Tab.1 Specific primer sequences for qPCR

引物 Primers	核苷酸序列 Nucleotide sequences (5' ~ 3')
<i>cyp11b</i>	Forward: CCATGTGATCTACGGGGAGC Reverse: TGATCGTGCCTTTCAGCAGT
<i>cyp19a1a</i>	Forward: AACGAATGCTTGCGATAC Reverse: CCTCCTGCTGATGCTCTA
18S	Forward: GGGTCCGAAGCGTTTACT Reverse: TCACCTCTAGCGGCACAA

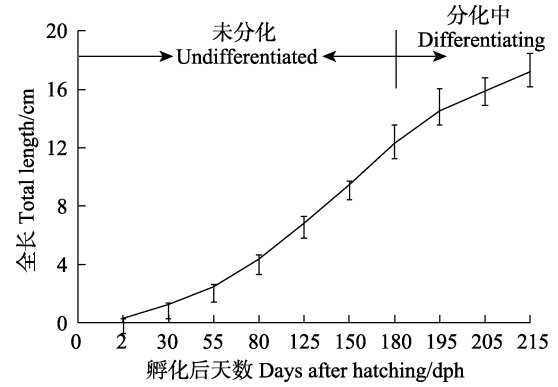


图 1 花鲈全长与孵化后天数之间的关系
Fig.1 The relationship between total length and the days post hatching of spotted sea bass

2 结果

2.1 花鲈性腺形成及分化

取样期间, 随着天数的增加, 花鲈全长呈平稳增长趋势。在 180 dph (days post hatching), 花鲈平均全长为(12.28±1.30) cm, 此前性腺处于未分化状态, 自此性腺开始出现组织学分化(图 1)。

2.1.1 原始性腺的形成和未分化性腺的发育 30 dph, 仔鱼平均全长为(1.28±0.10) cm。如图 2A 所示, PGCs 迁移到中肾管前端的腹腔膜周围。PGCs 呈圆形或椭圆形, 直径处于(6.48~7.26) μm 之间, 具有一个大且明亮的圆形细胞核, 被苏木精浓染成紫色, 而细胞质

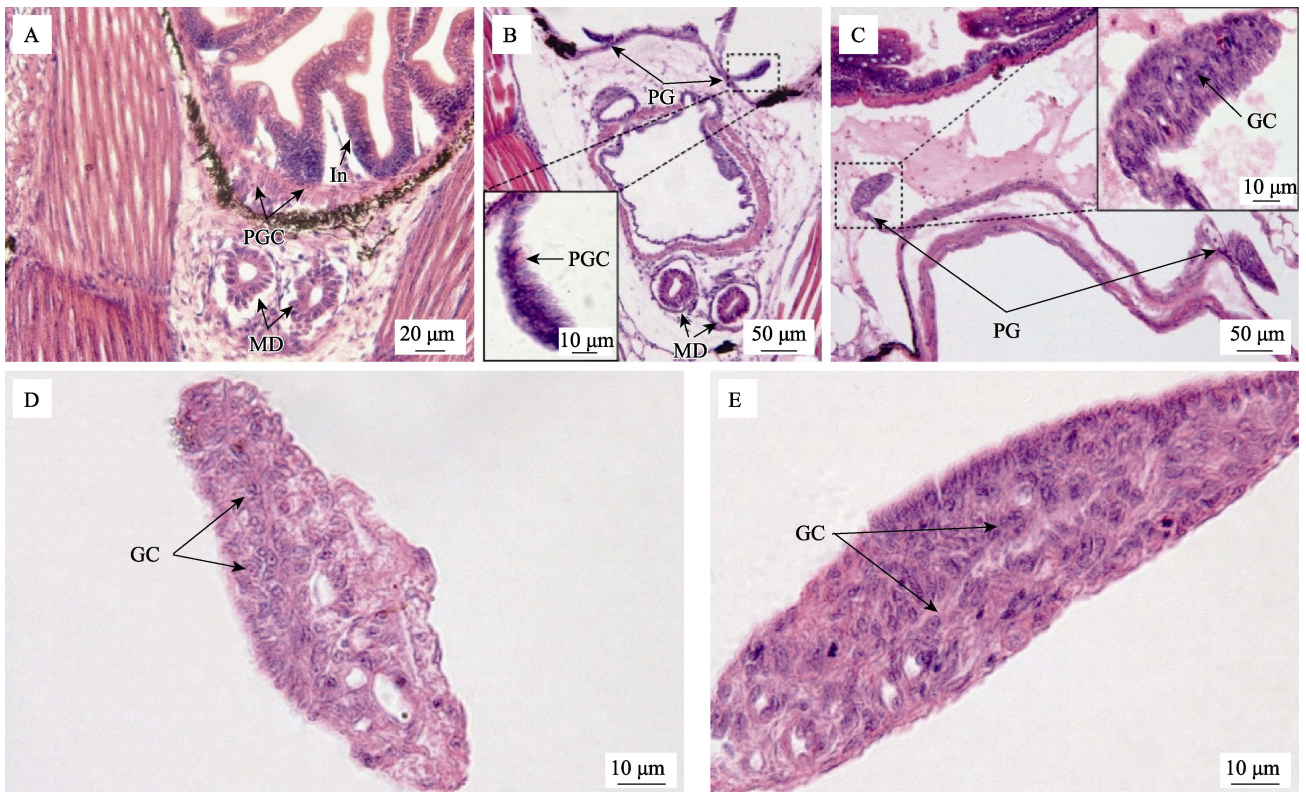


图 2 花鲈原始性腺和未分化性腺的发育

Fig.2 The development of primitive and undifferentiated gonads in spotted sea bass

A: 30 dph 的原始生殖细胞; B~E 分别为 55、80、125 和 180 dph 的原始性腺; A~C: 纵向切片; D~E: 横向切片

GC: 生殖细胞; In: 肠; MD: 中肾管; PG: 原始性腺; PGC: 原始生殖细胞

A: Primitive germ cells at 30 dph; B~E: Primitive gonads at 55, 80, 125, and 180 dph, respectively;
A~C: Longitudinal section of gonad; D~E: Transverse section of gonad
GC: Germ cell; In: Intestines; MD: Mesonephric duct; PG: Primitive gonad; PGC: Primitive germ cell

呈嗜弱酸性,着色较浅。

55 dph, 稚鱼平均全长为 (2.45 ± 0.19) cm。此时观察到 PGCs 已迁入生殖嵴中,并且一对原始性腺已经形成,呈对称分布,从腹腔后侧的肠系膜出发向前延伸。原始生殖细胞在原始性腺中排列较稀疏,周围有丰富的结缔组织(图 2B)。

80 dph, 幼鱼平均全长为 (4.33 ± 0.34) cm。牵引性腺一端的系膜变长,另一端持续向腹部延伸,体积明显增大,呈梨形,其中生殖细胞数量显著增加(图 2C)。

125 dph, 幼鱼平均全长为 (6.83 ± 0.49) cm。性腺继续生长,横切面平均长度为 (100.45 ± 9.20) μm ,宽度为 (38.90 ± 4.15) μm (图 2D)。

180 dph, 幼鱼平均全长为 (12.28 ± 1.30) cm, 原始性腺横切面平均长度增长至 (187.36 ± 19.18) μm , 宽度为 (49.02 ± 4.32) μm (图 2E)。此时伴随着有丝分裂的不断进行,性原细胞逐渐被体细胞包绕形成生殖细胞囊,散布在整个性腺中。

2.1.2 精巢和卵巢的早期分化 195 dph, 花鲈幼鱼平均全长为 (14.54 ± 1.54) cm, 在靠近背部的区域出现裂缝状的输精管,表明在解剖学上精巢已经开始分化,此时为 I 期精巢。I 期精巢的横切面为三角形,通过系膜与鳔组织相连,并且周围结缔组织丰富;在

靠近腹部的边缘区域观察到数个精原细胞(图 3A)。当精巢发育至 205 dph 时,靠近腹部的区域已被隔膜分割成很多小叶状结构,但排列较疏松(图 3B)。215 dph, 精巢继续发育,伴随着精原细胞强烈的有丝分裂,精小叶的排列变得紧密,形状不规则。精小叶由一圈精原细胞囊构成,每个生殖细胞囊周围都由 1 个或多个着色很深的 sertoli 前体细胞围绕;精小叶中间形成一个空腔即小叶腔,待精子成熟后可将其排出体外。精原细胞呈圆形或椭圆形,细胞核大而圆,占整个胞体体积的 4/5,并且有一个着色很深的核仁,相反细胞质不易着色(图 3C)。

205 dph, 花鲈幼鱼平均全长为 (15.86 ± 0.94) cm。如图 3D~E 所示,此时在性腺中部出现一条较整齐的细长条裂缝,将来发育为卵巢腔,这标志着组织学上卵巢的分化。I 期卵巢的横切面呈弯曲的梨形,靠近背部丰富的结缔组织和血管组织,卵原细胞分散的排列在性腺中。此时,仅凭大小和形态上的区别不能将卵原细胞和精原细胞区分开。

215 dph, 幼鱼平均全长为 (17.20 ± 1.28) cm。在卵巢中,随着性腺的分化,卵巢腔逐渐向外围延伸形成完整的腔体结构,此时产卵板开始形成,逐渐向卵巢腔内延伸,产卵板外侧分布着卵原细胞。卵原细胞形

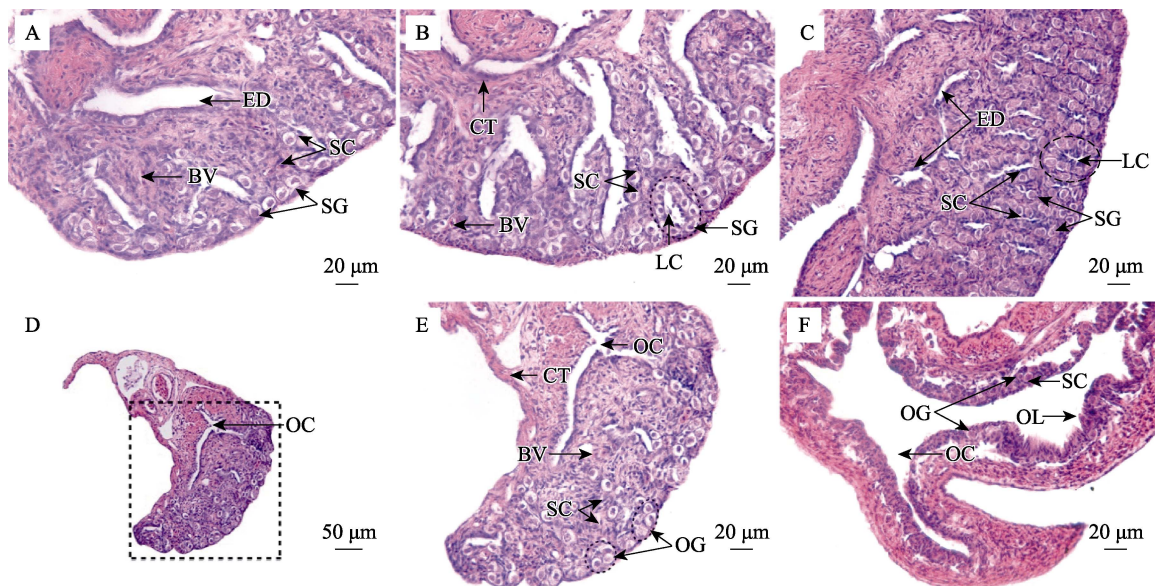


图 3 花鲈精巢和卵巢的早期分化

Fig.3 Differentiation of the testis and ovary in spotted sea bass

A~C 分别为 195、205 和 215 dph 的精巢; D、E: 205 dph 的卵巢(E 为 D 的放大图); F: 215 dph 的卵巢

BV: 血管; CT: 结缔组织; ED: 输精管; LC: 小叶腔; OC: 卵巢腔; OG: 卵原细胞;

OL: 产卵板; SC: 体细胞; SG: 精原细胞

A~C: Testis at 195, 205, and 215 dph, respectively; D, E: Ovary at 205 dph (E is an enlarged view of D); F: Ovary at 215 dph

BV: Blood vessel; CT: Connective tissue; ED: Efferent duct; LC: Lobular cavity; OC: Ovarian cavity;

OG: Oogonia; OL: Ovigerous lamellae; SC: Somatic cell; SG: Spermatogonia

态同精原细胞一样呈圆形或椭圆形,胞质较少,着色浅,大而圆的细胞核呈嗜碱性着色较深(图 3F)。

2.2 18 月龄花鲈幼鱼 II 期精巢和卵巢的发育

18 月龄花鲈幼鱼性腺发育到 II 期。II 期精巢在解剖镜下观察到与 I 期精巢组织结构相似,但血管组织增多。此阶段管腔内的生殖细胞主要包括精原细胞和初级精母细胞,与精原细胞相比,初级精母细胞体积明显缩

小,但细胞核的嗜碱性增强(图 4A~B)。

II 期卵巢与 I 期卵巢相比,产卵板变宽变长,呈大小不一的细长板状紧密排列在卵巢腔四周。此阶段仍有少量的卵原细胞,但大部分已停止有丝分裂,进入初级卵母细胞的小生长期阶段,此时的卵母细胞体积明显大于卵原细胞,核膜清晰,胞质增多且呈强嗜碱性,被染成深紫色,而细胞核则不易被染色,但核内有数个染成蓝紫色的核仁(图 4C~D)。

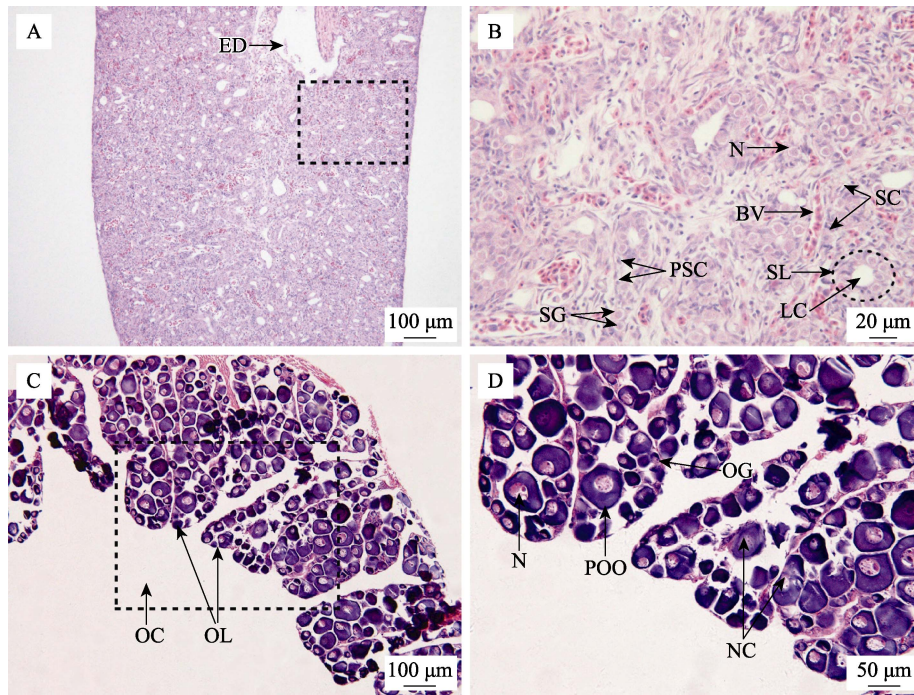


图 4 花鲈 II 期精巢和卵巢

Fig.4 Development of the testis and ovary in spotted sea bass

A、B: II 期精巢; C、D: II 期卵巢; B 和 D 分别为 A 和 C 的放大图

BV: 血管; ED: 输精小管; LC: 小叶腔;

N: 细胞核; NC: 核仁; OC: 卵巢腔; OG: 卵原细胞; OL: 产卵板; POO: 初级卵母细胞;

PSC: 初级精母细胞; SC: 体细胞; SL: 精小叶; SG: 精原细胞

A, B: Stage II testis; C, D: Stage II ovary; B and D are enlarged pictures of A and C, respectively

BV: Blood vessel; ED: Efferent duct; LC: Lobular cavity; N: Nucleus; NC: Nucleolus; OC: Ovarian cavity;

OG: Oogonia; OL: Ovigerous lamellae; POO: Primary oocyte; PSC: Primary spermatocyte;

SC: Somatic cell; SL: Seminiferous lobules; SG: Spermatogonia

2.3 *cyp11b* 和 *cyp19a1a* 基因的表达

利用 RT-qPCR 技术测定了花鲈芳香化酶基因 *cyp11b* 和 *cyp19a1a* 在性别分化初期幼鱼 I 期精巢和卵巢以及 18 月龄幼鱼 II 期精巢和卵巢中的相对表达水平,结果如图 5 所示。

在性别分化初期幼鱼的 I 期性腺中, *cyp11b* 在精巢中的表达量显著高于卵巢。随着性腺的发育,在 18 月龄幼鱼 II 期精巢中, *cyp11b* 的表达量显著高于同时期的卵巢及 I 期精巢(图 5A)。相反, *cyp19a1a*

在性别分化初期幼鱼的 I 期卵巢中的表达量显著高于同时期精巢,在 II 期卵巢中的表达量高于同时期的精巢,但明显低于 I 期卵巢(图 5B)。

3 讨论

3.1 性腺的发生及分化

PGCs 作为鱼类生殖细胞系的祖先,在胚胎发育的早期阶段就已经形成(宋卉等, 2004),然后按照特定的迁移路线到达生殖嵴的位置,与周围体细胞共同

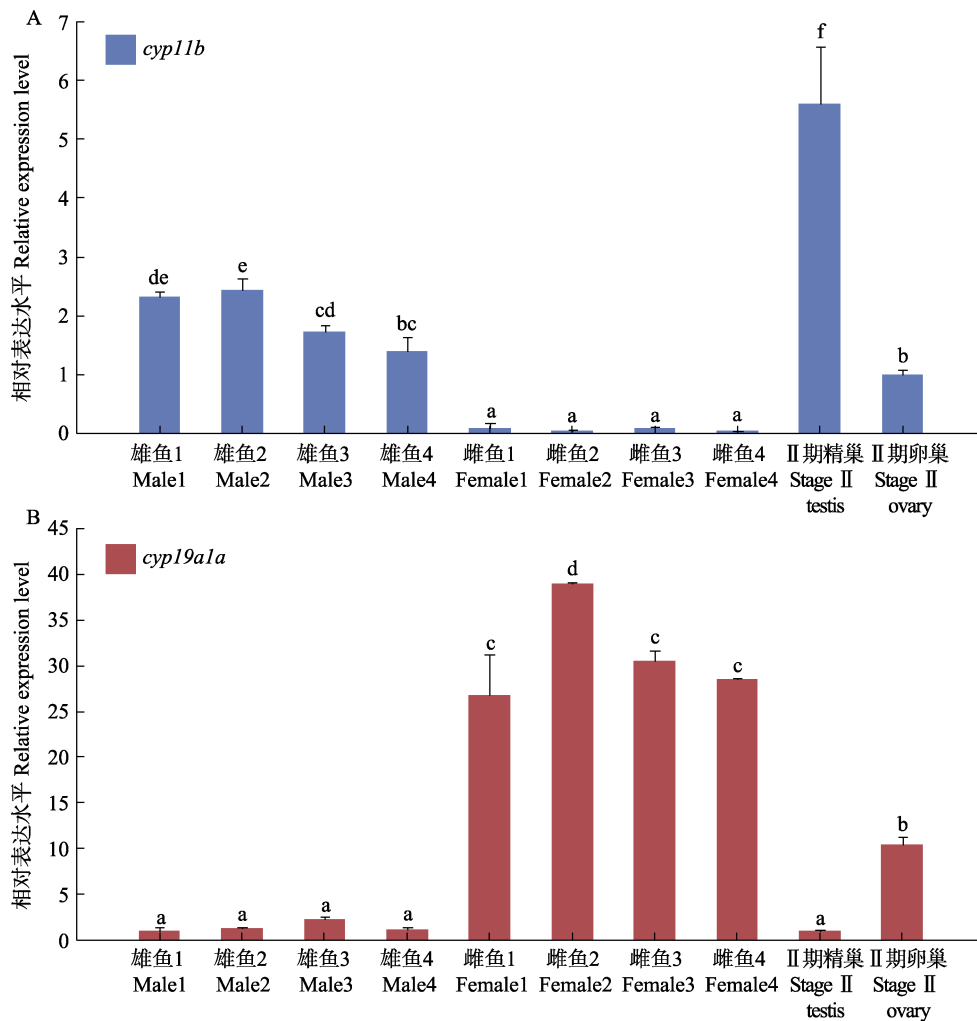


图 5 *cyp11b* 和 *cyp19a1a* 在性别分化初期(I 期)及 II 期精巢和卵巢中的相对表达水平

Fig.5 Relative expression levels of *cyp11b* and *cyp19a1a* in early sexual differentiation (stage I) and stage II testis and ovary

雄鱼 1~4 和雌鱼 1~4 分别代表性别分化初期(I 期)的 4 尾雄鱼个体和 4 尾雌鱼个体的性腺组织。

不同的字母表示差异显著($P < 0.05$)

Males 1~4 and females 1~4 represent the ovary and testis of 4 males and 4 females at the early stage of sexual differentiation (stage I) respectively. Different letters indicated significant difference ($P < 0.05$)

发育形成原始性腺。在不同鱼类中,原始性腺发生的时间各不相同。红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)于 12 dph 观察到一对原始性腺的形成(胡鹏等, 2015); 大黄鱼(*Larimichthys crocea*)于 20 dph 观察到由系膜悬挂在腹膜上皮上的原始性腺(游秀容, 2012); 牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)的原始性腺于 22 dph 形成于肾脏腹腔后方(杨阳, 2018); 许氏平鲈(*Sebastes schlegelii*)的原始性腺于 25 dpb (day post birth)起逐渐发育(王孝杰等, 2019)。在花鲈中, 30 dph 首次在性腺原基区域观察到 PGCs 的出现, 55 dph 观察到线形原始性腺已经形成, 因此, 推测 30 dph 前是花鲈胚后 PGCs 迁移至生殖嵴的关键时期, 原始性腺发生在 30~55 dph 之间。

在硬骨鱼类中,雌雄异体型是最常见的性腺分化类型,大多数雌雄异体的鱼类未分化性腺将直接分化为卵巢或精巢(Devlin *et al*, 2002)。鱼类的性腺分化包括解剖学分化和细胞学分化 2 个方面,解剖学分化是指卵巢腔、输精管和血管的形成等组织形态的变化,细胞学分化的标志为生殖细胞开始进入减数分裂(宋卉等, 2004)。一般解剖学分化早于细胞学分化(党广成等, 2011; 杨阳, 2018)。不同鱼类的性腺分化时间存在较大差异,即使是同一物种,雌性和雄性的性腺分化时间也不同。在许氏平鲈中, 35 dpb 时卵巢腔开始形成, 68 dpb 时输精管开始形成(王孝杰等, 2019)。大黄鱼卵巢的解剖学分化开始于 55 日龄,精巢的解剖学分化开始于 95 日龄(游秀容, 2012)。在圆

斑星鲈(*Verasper variegatus*)中, 60 日龄的雌鱼性腺开始出现卵巢腔, 而同时期的雄鱼没有明显的性腺分化特征(杨珍珍等, 2020; 张乐乐, 2018)。在斑石鲷(*Oplegnathus punctatus*)中, 120 日龄观察到输精管原基的出现, 150 日龄观察到卵巢腔的出现(赵玉柱等, 2020)。花鲈幼鱼在 180 dph 时, 性腺还处于未分化状态(图 2E), 随后在 195 dph 时观察到输精管的出现, 表明精巢在解剖学上开始分化, 于 207 dph 观察到卵巢腔的形成, 表明卵巢解剖学分化已经开始, 在此阶段雌雄性腺均未出现细胞学分化的标志。这说明与大多数鱼类一样(杨阳, 2018; 游秀容, 2012; 张乐乐, 2018), 花鲈性腺的解剖学分化要早于细胞学分化。

3.2 *cyp11b* 和 *cyp19a1a* 在精巢和卵巢中的表达

在鱼类性别决定和分化过程中, 性类固醇激素发挥重要作用。芳香化酶基因属于细胞色素 P450 超家族的成员, 这种复合酶可将雄激素转化为雌激素, 而雌激素是促进卵巢分化的重要因子(Simpson *et al.*, 2002)。在鱼类中, 存在性腺芳香化酶和脑芳香化酶 2 种类型, 分别由 *cyp19a1a* 和 *cyp19a1b* 编码(Kishida *et al.*, 2001)。*cyp19a1a* 基因在脊椎动物中以高度保守的方式在性别决定的早期表现出性别二态性, 在雌性性腺中呈现高表达, 这使得该基因成为性别决定和卵巢分化的关键因子(王金等, 2014; Driscoll *et al.*, 2020)。*cyp19a1a* 在尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*) (Ijiri *et al.*, 2008)、齐口裂腹鱼(*Schizothorax prenanti*) (Yan *et al.*, 2019)、茅耙丽鱼(*Pelvicachromis pulcher*) (Driscoll *et al.*, 2020)等多种鱼类卵巢中的表达量显著高于精巢, 都表明其在卵巢发育中发挥更重要作用, 而其在精巢中也存在低表达, 是因为通过芳构化产生的低水平雌激素对精子形成是必要的(Schulz *et al.*, 2010)。细胞色素 P450 家族的另一个成员 11 β -羟化酶基因(*cyp11b*)是催化 11-酮基睾酮(11-KT)合成所必需的, 而 11-KT 是硬骨鱼类内源性的雄激素, 对阻碍卵巢分化并导致精巢的分化及维持有重要作用(王婷茹, 2013; Driscoll *et al.*, 2020)。在尼罗罗非鱼(Ijiri *et al.*, 2008; 康恺等, 2020)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*) (Vizziano *et al.*, 2007)、日本鳗鲡(*Anguilla japonica*) (Jianga *et al.*, 1996)等多种硬骨鱼的精巢分化早期阶段 *cyp11b* 都被检测到高表达。更重要的是, 在与花鲈进化关系很近的欧洲鲈中, *cyp19a1a* 和 *cyp11b* 的表达差异可在组织学水平性别分化迹象前 1 个月检测到, 它们分别与未来的雌雄表型有明显的相关性, 因此, 它们可作为组织学上未分化欧洲鲈表型性别预测的早期分子标记(Blázquez *et al.*, 2009)。本研究表

明, 在花鲈性别分化初期(I 期)以及性腺发育到 II 期的雌鱼和雄鱼中, *cyp11b* 在 I 期和 II 期精巢中的表达都显著高于卵巢, 相反, *cyp19a1a* 在 I 期和 II 期卵巢中的表达都显著高于精巢, 与在其他硬骨鱼中的表达趋势一致。结果说明, 在性腺分化及维持期间, *cyp11b* 在精巢中扮演更重要的角色, 而 *cyp19a1a* 主要是在卵巢中发挥作用。由于目前在花鲈中尚缺乏性别相关的遗传分子标记, 所以不能确定在组织学上的性别分化标志出现之前, *cyp19a1a* 和 *cyp11b* 的表达趋势是否可以预测未来卵巢和精巢的分化。但是, 根据欧洲鲈的研究结论, 结合本研究结果, 有理由推测, 在花鲈性腺分化的第 1 个组织学特征明显之前, *cyp19a1a* 和 *cyp11b* 在性腺中的差异表达或许可能成为预测未来分化成卵巢和精巢的分子依据。

参 考 文 献

- BLÁZQUEZ M, NAVARRO-MARTÍN L, PIFERRER F. Expression profiles of sex differentiation-related genes during ontogenesis in the European sea bass acclimated to two different temperatures. *Journal of Experimental Zoology, Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 2009, 312B(7): 686–700
- CHENG Q T, ZHENG B S. Fish system retrieval of China. Beijing: Science Press, 1987, 327–332 [成庆泰, 郑葆珊. 中国鱼类系统检索. 北京: 科学出版社, 1987, 327–332]
- CHI M L. Cloning of reproductive genes and their expressive manipulation analysis in male spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*). Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2015 [迟美丽. 花鲈繁殖相关基因的克隆及其在雌性个体中的表达调控分析. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2015]
- DANG G C, LIU Y Q, FU P S, *et al.* Effect of high-temperature treatment on sex differentiation and growth in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2011, 32(5): 32–37 [党广成, 刘羽清, 付佩胜, 等. 高温诱导对尼罗罗非鱼性别分化及生长的影响. 渔业科学进展, 2011, 32(5): 32–37]
- DEVLIN R H, NAGAHAMA Y. Sex determination and sex differentiation in fish: An overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, 2002, 208(3/4): 191–364
- DRISCOLL R M H, FABER-HAMMOND J J, O'ROURKE C F, *et al.* Epigenetic regulation of gonadal and brain aromatase expression in a cichlid fish with environmental sex determination. *General and Comparative Endocrinology*, 2020, 296(15): 113538
- HAN F. The indoor artificial breeding and developmental morphology of larva and juvenile in *Lateolabrax maculatus*. Master's Thesis of Ocean University of China, 2016 [韩枫. 花鲈室内人工繁育与仔稚鱼形态学研究. 中国海洋大学

- 硕士研究生学位论文, 2016]
- HU P, LIU X F, LIU B, *et al.* Histological observation on the gonadal differentiation of tiger puffer (*Takifugu rubripes*). *Periodical of Ocean University of China (Natural Science)*, 2015, 45(10): 25–30 [胡鹏, 刘新富, 刘滨, 等. 红鳍东方鲀性腺的组织学分化. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2015, 45(10): 25–30]
- IJIRI S, KANEKO H, KOBAYASHI T, *et al.* Sexual dimorphic expression of genes in gonads during early differentiation of a teleost fish, the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Biology of Reproduction*, 2008, 78(2): 333–341
- JIANGA J Q, KOBAYASHI T, GE W, *et al.* Fish testicular 11 β -hydroxylase: cDNA cloning and mRNA expression during spermatogenesis. *FEBS Letters*, 1996, 397(2/3): 250–252
- KANG K, WU J, YUAN L Y, *et al.* Establishment and optimization of an isolation and culture system for sertoli cells of Nile tilapia. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(1): 119–126 [康恺, 吴江, 苑麟勇, 等. 尼罗罗非鱼精巢支持细胞分离培养体系建立及优化. *渔业科学进展*, 2020, 41(1): 119–126]
- KISHIDA M, CALLARD G V. Distinct cytochrome P450 aromatase isoforms in zebrafish (*Danio rerio*) brain and ovary are differentially programmed and estrogen regulated during early development. *Endocrinology*, 2001, 142(2): 740–750
- KOBAYASHI Y, HORIGUCHI R, MIURA S, *et al.* Sex- and tissue- specific expression of P450 aromatase (*cyp19a1a*) in the yellowtail clownfish, *Amphiprion clarkii*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2010, 155(2): 237–244
- LI Y H, SUN P. The progress in fish sex determination and its mechanisms. *Modern Fisheries Information*, 2011, 26(12): 10–15 [李云航, 孙鹏. 鱼类性别决定机制及相关基因研究进展. *现代渔业信息*, 2011, 26(12): 10–15]
- LU C, SU L N, ZHU B K. Advances on the genes related with sex determination and differentiation of fish. *Hubei Agricultural Sciences*, 2014, 53(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. *湖北农业科学*, 2014, 53(13): 2981–2986]
- SCHULZ R W, DE FRANÇA L R, LAREYRE J J, *et al.* Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 165(3): 390–411
- SIMPSON E R, CLYNE C, RUBIN G, *et al.* Aromatase: A brief overview. *Annual Review of Physiology*, 2002, 64(1): 93–127
- SI Y F, DING Y X, HE F, *et al.* DNA methylation level of *cyp19a1a* and *Foxl2* gene related to their expression patterns and reproduction traits during ovary development stages of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Gene*, 2016, 575(2): 321–330
- Song H, Wang SY. Progress in fish primordial germ cells. *Progress in Veterinary Medicine*, 2004, 25(5): 22–23 [宋卉, 王树迎. 鱼类原始生殖细胞的研究进展. *动物医学进展*, 2004, 25(5): 22–23]
- STRÜSSMANN C A, NAKAMURA M. Morphology, endocrinology and environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2002, 26(1): 13–29
- SUN G Y, ZHU Y Y, ZHOU Z L, *et al.* The reproductive biology of *Lateolabrax japonicus* in the Yangtze River estuary and Zhejiang offshore waters. *Journal of Fisheries of China*, 1994, 18(1): 18–23 [孙幅英, 朱云云, 周忠良, 等. 长江口及浙江沿海花鲈的繁殖生物学. *水产学报*, 1994, 18(1): 18–23]
- TANG B, HU W, HAO J, *et al.* Developmental expression of steroidogenic factor-1, *cyp19a1a* and *cyp19a1b* from common carp (*Cyprinus carpio*). *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 167(3): 408–416
- VIZZIANO D, RANDUINEAU G, BARON D, *et al.* Characterization of early molecular sex differentiation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Developmental Dynamics*, 2007, 236(8): 2198–2206
- WANG H, WEN H, LI Y, *et al.* Evaluation of potential reference genes for quantitative RT-PCR analysis in spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*) under normal and salinity stress conditions. *PeerJ*, 2018, 6(19): e5631
- WANG J, WEN C G, ZHAO Y, *et al.* The prokaryotic expression and the protein purification of Nile tilapia *cyp19a1a* gene. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(4): 45–50 [王金, 文春根, 赵燕, 等. 尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*) *cyp19a1a* 原核表达与蛋白纯化. *渔业科学进展*, 2014, 35(4): 45–50]
- WANG X J, ZHANG S M, LI J F, *et al.* Studies on histology and gene expression pattern of primitive gonadal differentiation and sex hormone level of black rockfish *Sebastes schlegelii*. *Periodical of Ocean University of China (Natural Science)*, 2019, 49(S2): 8–20 [王孝杰, 张思敏, 李吉方, 等. 许氏平鲈早期性腺分化组织学与性激素水平、性腺分化相关基因表达特征. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2019, 49(S2): 8–20]
- WANG T R. Antibody preparation and expression of Dmrt1, Amh and Cyp11b2 in gonads of Nile tilapia during normal development and sex reversal. Master's Thesis of Southwest University, 2013 [王婷茹. 尼罗罗非鱼 Dmrt1、Amh 和 Cyp11b2 抗体制备及其在正常发育和性逆转性腺中的表达研究. 西南大学硕士研究生学位论文, 2013]
- 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. *Marine Sciences*, 2008, 32(1): 74–80 [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. *海洋科学*, 2008, 32(1): 74–80]
- WEN H S, LI J F, ZHANG M Z, *et al.* Physiology and breeding technology of sea bass in mariculture. Beijing: China Aquaculture Press, 2019, 346–347 [温海深, 李吉方, 张美昭, 等. 海水养殖鲈鱼生理学与繁育技术. 北京: 中国农业出版社, 2019, 346–347]
- YAN T M, CAI Y P, HE J Y, *et al.* Characterization and expression profiles of *cyp19a1a* in the schizothoracine fish *Schizothorax prenanti*. *Tissue and Cell*, 2019, 58: 70–75
- YANG Y. Study on the mechanism and patten of germ cell proliferation and differentiation in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Doctoral Dissertation of University of Chinese Academy of Sciences (Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences), 2018 [杨阳. 牙鲆生殖细胞增殖、分化规律及分子机制的研究. 中国科学院大学(中国科学院海洋研究所)博士研究生学位论文, 2018]
- YANG Z Z, BIAN L, ZHANG Y, *et al.* Cloning and expression

- of the *piwil2* gene in the spotted halibut (*Verasper variegatus*). Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(2): 103–112 [杨珍珍, 边力, 张岩, 等. 圆斑星鲽 *piwil2* 基因的克隆与表达分析. 渔业科学进展, 2020, 41(2): 103–112]
- YOU X R. Histological studies on the origin and migration of the primordial germ cells and gonadal sex differentiation in large yellow croaker *Larimichthys crocea*. Master's Thesis of Jimei University, 2012 [游秀容. 大黄鱼原始生殖细胞发生、迁移及性腺性别分化的组织学研究. 集美大学硕士研究生学位论文, 2012]
- ZHANG L L. The study of gonadal differentiation process and sex-related gene *sox3*, *sox9* of spotted halibut. Master's thesis of Shanghai Ocean University, 2018 [张乐乐. 圆斑星鲽性腺分化过程及性别相关基因 *sox3*、*sox9* 的研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2018]
- ZHAO Y Z, CHEN Z F, MA T, *et al.* Histological observation of gonad development in spotted knifejaw (*Oplegnathus punctatus*). Journal of Shanghai Ocean University, 2020, 30(4): 675–683 [赵玉柱, 陈张帆, 马腾, 等. 斑石鲷性腺发育的组织学观察. 上海海洋大学学报, 2020, 30(4): 675–683]

(编辑 马瑾艳)

Histology of Gonadal Differentiation and Expression Analysis of Sex-Related Genes *cyp11b*, *cyp19a1a* in Spotted Sea Bass (*Lateolabrax maculatus*)

LI Bingyu, WEN Haishen, WANG Lingyu, LI Jinku, QI Xin, LI Yun^①

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

Abstract The gonadogenesis, the development and differentiation of larvae and juveniles from 1~214 days post hatching (dph) and 18-month-old female and male spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*) were studied. The relationship between the expression of sex-related genes (*cyp11b* and *cyp19a1a*) and sex in the process of gonadal differentiation was discussed. The results showed that at 30 dph [(1.28±0.10) cm], primordial germ cells (PGCs) were first observed around the peritoneal membrane at the front end of the mesonephric duct, indicating that the time before 30 dph was the critical period for PGCs to migrate to the genital ridge. At 55 dph [(2.45±0.19) cm], a pair of symmetrically distributed primitive gonads was observed, indicating that the primitive gonads of the juvenile spotted sea bass were formed between 30 and 55 dph [(1.28~2.45) cm]. Between 55~180 dph [(2.45~12.28) cm], the primordial gonads continued to grow and remained in an undifferentiated state. After 180 dph, the gonads began to differentiate; at 195 dph [(14.54±1.54) cm], we observed that the testis began to differentiate, while the ovary began to differentiate at 205 dph [(15.86±0.94) cm]. The anatomical differentiation of the gonads was earlier than the cytological differentiation in spotted sea bass. The gonad of 18-month-old spotted sea bass developed to stage II. The expression level of the sex differentiation-related gene *cyp19a1a* in the ovary of spotted sea bass was higher than that of the contemporaneous testis, indicating that it played a key role in the differentiation and maintenance of the ovary. The expression level of *cyp11b* at stage II testis of 18-month-old juveniles was significantly higher than in the contemporaneous ovary and stage I testes, suggesting that it played a crucial part in the differentiation and maintenance of testes. The results not only enriched our understanding of the reproductive physiology of spotted sea bass, but also provided a scientific basis for the study of sex selection technology.

Key words *Lateolabrax maculatus*; Gonad differentiation; Histology; *cyp11b*; *cyp19a1a*

① Corresponding author: LI Yun, E-mail: yunli0116@ouc.edu.cn