

文章编号: 1000-0615(2004)03-0225-06

性外激素诱发中华乌塘鳢产卵的初步研究

洪万树^{1,2}, 赵卫红¹, 马细兰¹, 郭晓峰¹, 张其永¹, 柴敏娟¹, 郑微云²

(1. 厦门大学海洋学系, 福建 厦门 361005; 2. 厦门大学环境科学研究中心, 福建 厦门 361005)

摘要: 在陶瓷人工产卵管道内吊挂性外激素的研究表明, 卵巢提取液对雄鱼的吸引作用大于雌鱼, 而精巢和贮精囊提取液对雌鱼的吸引作用则大于雄鱼, 17α -P、 17α 、 20β -P 和 PGE_2 对雌鱼和雄鱼均具有相似的吸引作用。雌鱼在管道内的产卵次数、产卵量以及成熟卵的受精率均与产卵管道内吊挂的性外激素种类有关, 17α 、 20β -P 和 PGE_2 两个实验组产卵次数最多, 其中 PGE_2 实验组的产卵量和受精率最高。 17α -P 在贮精囊和精巢提取液中的含量显著高于卵巢提取液 ($P < 0.05$); 贮精囊提取液中 PGE_2 和 $PGF_{2\alpha}$ 的含量分别显著高于精巢提取液和卵巢提取液 ($P < 0.05$); 提取液中 PGE_2 和 $PGF_{2\alpha}$ 的含量均依次为贮精囊提取液 > 精巢提取液 > 卵巢提取液。卵巢提取液刺激雄鱼所引起的平均 EOG 高于雌鱼, 而精巢和贮精囊提取液刺激雌鱼所引起的平均 EOG 高于雄鱼, 雌鱼和雄鱼对 17α -P、 17α 、 20β -P、 PGE_2 和 $PGF_{2\alpha}$ 刺激所产生的平均 EOG, 以 PGE_2 为最高。

关键词: 中华乌塘鳢; 性外激素; 诱发产卵; 嗅电图

中图分类号: Q579.1; S961.1⁺3 文献标识码: A

A preliminary study on the induction of spawning by sex pheromones in *Bostrichthys sinensis*

HONG Wan-shu^{1,2}, ZHAO Wei-hong¹, MA Xi-lan¹,

GUO Xiao-feng¹, ZHANG Qi-yong¹, CHAI Min-juan¹, ZHENG Wei-yun²

(1. Department of Oceanography, Xiamen University, Xiamen 361005, China;

2. Environmental Science Research Center, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: The results obtained from fixing sex pheromones to the inside surface of the artificial ceramic spawning nests showed that ovarian extract attracted more males than females to enter the nests, while testis extract and seminal vesicle extract attracted more females than males. 17α -P, 17α , 20β -P and PGE_2 were equally effective in attracting both females and males. Spawning frequencies and the spawned egg number of females as well as fertilization rates were related to different kinds of sex pheromones. The most spawning frequencies were found in both 17α , 20β -P and PGE_2 treated groups. The greatest spawned egg number and the highest fertilization rate were observed in PGE_2 group. The levels of 17α -P in seminal vesicle extract and testis extract were significantly higher ($P < 0.05$) than that in ovarian extract. The levels of PGE_2 and $PGF_{2\alpha}$ in seminal vesicle extract were significantly higher ($P < 0.05$) than those in testis and ovarian extract. The levels of both PGE_2 and $PGF_{2\alpha}$ in sexual organs were in the order of seminal vesicle extract > testis extract > ovarian extract. The mean EOG, stimulated by ovarian extract, was higher in males than in females, whereas the mean EOGs, stimulated by testis

收稿日期: 2002-12-02

资助项目: 国家自然科学基金资助项目(40276040)

作者简介: 洪万树(1955-), 男, 福建厦门人, 教授, 主要从事海水鱼类繁殖生物学研究。Tel: 0592-2186495, E-mail: wshong@jingxian.

or seminal vesicle extract, were higher in females than in males. The mean highest EOG of both females and males in response to 17 α -P, 17 α , 20 β -P, PGE₂ and PGF_{2 α} was observed in PGE₂ group.

Key words: *Bostrichthys sinensis*; sex pheromones; induction of spawning; electro-olfactogram (EOG)

性外激素 (sex pheromones) 是指动物释放于体外, 能引起种群中异性个体产生一种或多种生理反应的化学物质^[1]。硬骨鱼类的性外激素包括性类固醇激素 (17 α - 羟基孕酮、17 α , 20 β - 双羟孕酮) 及多种前列腺素等, 这些物质主要存在于性成熟鱼类的卵巢、精巢和贮精囊中^[2,3]。性外激素在鱼类生殖过程中起体外化学信号的作用, 当它们从鱼体内释放到水体后, 种群内个体通过嗅觉来感觉异性释放的性外激素, 从而诱发同种鱼类雌雄个体之间的求偶、交配和产卵等生殖行为^[4]。

中华乌塘鳢 (*Bostrichthys sinensis*) 分布于潮间带滩涂, 营穴居生活, 是我国东南沿海主要海水养殖鱼类之一^[5]。自然条件下, 成熟雌雄个体在生殖期间择偶配对进入洞穴中交配产卵。根据其生殖习性, 在进行中华乌塘鳢人工育苗时, 通常以陶瓷或塑料管道置于产卵池内作为人工鱼巢诱导亲鱼交配产卵^[6]。但亲鱼在人工鱼巢内产卵不多, 大部分卵产于池底和池壁, 受精率低, 不利于受精卵的收集和孵化。

本文以性成熟中华乌塘鳢的卵巢、精巢和贮精囊提取液以及人工合成的性类固醇激素和前列腺素作为性外激素吊挂在陶瓷人工产卵管道内, 观察进入产卵管道内雌鱼和雄鱼的数量和产卵情况, 同时以嗅电图 (electro-olfactogram, EOG) 为指标, 比较性成熟中华乌塘鳢雌鱼或雄鱼对不同性外激素刺激产生的 EOG 值, 并测定卵巢、精巢和贮精囊提取液中性类固醇激素和前列腺素的含量, 探讨性外激素在中华乌塘鳢生殖过程中的作用和机理, 为提高中华乌塘鳢在人工鱼巢内的产卵率提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

性成熟中华乌塘鳢购自厦门市农贸市场。雌鱼选择腹部膨大并有明显的卵巢轮廓, 尿殖乳突圆形膨大且呈鲜红色, 体长 14.6~16.9 cm, 体重 68.2~126.8 g; 雄鱼选择尿殖乳突三角形突起且呈粉红色, 体长 11.0~15.9 cm, 体重 37.2~114.1 g。

1.2 提取液的制备及激素含量的测定

分别取出性成熟中华乌塘鳢的卵巢、精巢和贮精囊, 称重后加入无水乙醇, 搅拌或捣碎后离心 5 min (4000 r·min⁻¹), 取上清液, 即为卵巢提取液、精巢提取液和贮精囊提取液。应用酶联免疫吸附分析法 (ELISA), 以酶标仪 (BIO-RAD550, 美国产) 测定提取液中 17 α - 羟基孕酮 (17 α -P)、前列腺素 E₂ (PGE₂) 和前列腺素 F_{2 α} (PGF_{2 α}) 的含量。每组实验鱼测定 6 个样品。实验测得数据均表示为平均值士标准差, 经方差分析, 检验各项样品之间含量平均值的差异显著性, 当 $P < 0.05$ 时, 认为差异显著。用于诱发产卵的提取液以氮气吹干后冷冻备用。

1.3 药品试剂

17 α -P、17 α , 20 β - 双羟孕酮 (17 α , 20 β -P)、PGE₂ 和 PGF_{2 α} 等 4 种人工合成激素均为美国 Sigma 公司产品, 甲醇溶解。用于吸引异性和诱发产卵时分别取 10 μ g, 氮气吹干后加生理盐水; 用于刺激嗅上皮的浓度均为 10⁻⁸ mol·L⁻¹, 氮气吹干后以 7.3% 蔗糖溶液配制。LHRH-A₃ 和 HCG 为宁波市激素制品有限公司产品。17 α -P 酶联免疫试剂盒为美国 Diagnostic Systems Laboratories 产品, PGE₂ 和 PGF_{2 α} 酶联免疫试剂盒为美国 Cayman 化学公司产品。

1.4 产卵池和陶瓷人工产卵管道

产卵池 4 个, 每个 4.68 m² (2.6 m × 1.8 m)。人工产卵管道以陶瓷制作 (长 50 cm, 宽 9.5 cm, 高 7.5 cm), 两端开口 (直径 5.0 cm), 由上下两部分组成, 可分开或组合^[7], 以便检查产卵情况。管道排列于产卵池底部, 管道间隔为 50 cm。

1.5 性外激素诱发产卵

每个产卵池内放置 8 个陶瓷人工产卵管道, 亲鱼对数与管道数的比例为 1:1。每种性外激素分别加入 1 mL 生理盐水, 装入 2 mL 塑料管内, 管口塞少许棉花, 吊挂于陶瓷人工产卵管道上半部内侧, 每个管道吊挂 1 种性外激素, 激素通过渗透作用缓慢地释放到管道内的水体中。每种性外激素均设 1 个平行组, 两组相同的实验分别同时在两个产卵池中进行。亲鱼入产卵池前注射激素催

熟,雌鱼剂量为 HCG 100IU + LHRH-A₃ 1.0 μ g \cdot ind⁻¹,雄鱼注射剂量减半。每次诱发产卵的效应时间为 48~72h,相同的实验内容重复 3 次,实验期间检查管道内亲鱼的数量、性比和产卵情况,并计算产卵量和受精率,实验数据取自两个产卵池。产卵池上方覆盖黑布或遮阴网,保持弱光环境,不充气。实验期间水温 26 $^{\circ}$ C~28 $^{\circ}$ C,盐度 17~21。

1.6 EOG 测定

测定 EOG 的实验装置和步骤参照参考文献 [8]。各种性外激素刺激嗅上皮的时间为 10s,刺激间隔为 2.5~5min。用于测定 EOG 的雌鱼和雄鱼各 10 尾,以 EOG(mv) 平均值作为雌鱼或雄鱼对

不同性外激素刺激反应的判断标准。

2 结果

2.1 性外激素对亲鱼的吸引作用

以卵巢、精巢、贮精囊提取液和 4 种人工合成激素作为性外激素引诱中华乌塘鳢,从 3 次重复实验结果可知,吊挂有性外激素的产卵管道内(除了 PGF_{2 α} 组外)亲鱼的数量均多于对照组;所有吊挂性外激素的陶瓷人工产卵管道内都发现有雌鱼和雄鱼,但吊挂有卵巢提取液的产卵管道内雄鱼总数多于雌鱼,而吊挂有精巢提取液或贮精囊提取液的产卵管道内雌鱼总数则多于雄鱼(表 1)。

表 1 性外激素对中华乌塘鳢进入陶瓷人工产卵管道的吸引作用

Tab. 1 Attractive effects of sex pheromones on fish entering the artificial nests in *B. sinensis*

性外激素种类 sex pheromones	第一次实验 the 1st exp.			第二次实验 the 2nd exp.			第三次实验 the 3rd exp.		
	亲鱼尾数 broodfish	雌/雄尾数 female/male	雌雄百分比(%) percentage	亲鱼尾数 broodfish	雌/雄尾数 female/male	雌雄百分比(%) percentage	亲鱼尾数 broodfish	雌/雄尾数 female/male	雌雄百分比(%) percentage
卵巢提取液 ovarian extract	3	1♀/2♂	33/67	3	1♀/2♂	33/67	5	3♀/1♂	40/60
精巢提取液 testis extract	3	1♀/2♂	33/67	5	4♀/1♂	80/20	3	2♀/1♂	67/33
贮精囊提取液 seminal vesicle extract	3	4♀/1♂	80/20	3	2♀/1♂	67/33	4	2♀/2♂	50/50
17 α -P	3	1♀/2♂	33/97	3	2♀/1♂	67/33	4	2♀/2♂	50/50
17 α , 20 β -P	3	2♀/1♂	67/33	5	2♀/3♂	40/60	4	2♀/2♂	50/50
PGE ₂	4	3♀/1♂	75/25	4	2♀/2♂	50/50	4	1♀/3♂	25/75
PGF _{2α}	3	2♀/1♂	67/33	2	1♀/1♂	50/50	2	1♀/1♂	50/50
对照组 control	2	1♀/1♂	50/50	2	1♀/1♂	50/50	3	1♀/2♂	33/67

表 2 性外激素对中华乌塘鳢产卵的作用

Tab. 2 Effects of sex pheromones on spawning in *B. sinensis*

性外激素种类 sex pheromones	第一次实验 the 1st exp.			第二次实验 the 2nd exp.			第三次实验 the 3rd exp.		
	产卵管道数 spawned nests	产卵量 (ind) spawned eggs	受精率(%) fertilization	产卵管道数 spawned nests	产卵量 (ind) spawned eggs	受精率(%) fertilization	产卵管道数 spawned nests	产卵量 (ind) spawned eggs	受精率(%) fertilization
卵巢提取液 ovarian extract	1	110	45	1	450	65	0	0	0
精巢提取液 testis extract	0	0	0	1	100	45	0	0	0
贮精囊提取液 seminal vesicle extract	0	0	0	1	120	50	0	0	0
17 α -P	0	0	0	1	150	50	1	1100	65
17 α , 20 β -P	1	180	50	1	100	40	1	250	60
PGE ₂	1	300	50	1	1900	65	1	4000	90
PGF _{2α}	0	0	0	0	0	0	0	0	0
对照组 control	0	0	0	0	0	0	0	0	0

2.2 性外激素对产卵的作用

性外激素诱发中华乌塘鳢产卵的实验结果见表2。从表2看出,除PGF_{2α}组外,人工产卵管道内吊挂有性外激素的实验组都发现有亲鱼产卵,但产卵次数、管道内的产卵量和受精率均与性外激素种类有关。17α, 20β-P和PGE₂两个实验组的产卵次数最多,PGE₂实验组的产卵量和受精率最高(表2和图1)。对照组未发现亲鱼产卵。

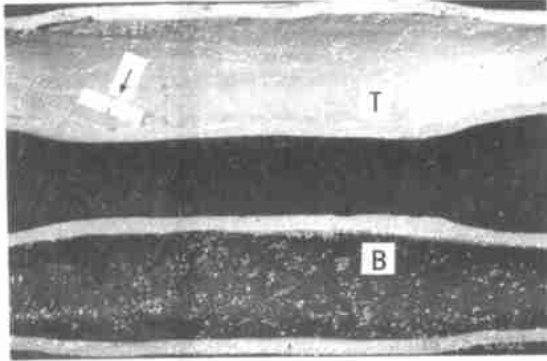


图1 PGE₂实验组陶瓷人工产卵管道内粘附的受精卵

Fig.1 Fertilized eggs adhering to the inner surface of the nest in the group PGE₂

注:箭头所示为装有性外激素的塑料管,T为管道的上半部,B为管道的下半部

Notes: the arrow shows the plastic tube filled with sex pheromone. T shows the top half of the nest, and B shows the bottom half of nest

2.3 提取液中激素的含量

性成熟中华乌塘鳢卵巢、精巢和贮精囊提取液中的17α-P, PGE₂和PGF_{2α}含量见图2和图3。17α-P在贮精囊和精巢提取液中的含量显著高于卵巢提取液(P<0.05)。提取液中PGE₂和PGF_{2α}的含量均依次为:贮精囊提取液>精巢提取液>卵巢提取液。贮精囊提取液中PGE₂和PGF_{2α}的含量分别显著高于精巢提取液和卵巢提取液(P<0.05)。

2.4 对性外激素刺激反应的EOG

用于吸引异性和诱发产卵的3种提取液和4种人工合成的激素对中华乌塘鳢嗅上皮刺激所引起的EOG反应见图4。卵巢提取液刺激雄鱼所引起的平均EOG高于雌鱼,而精巢提取液和贮精囊提取液刺激雌鱼所引起的平均EOG高于雄鱼。雌鱼和雄鱼对17α-P, 17α, 20β-P, PGE₂和PGF_{2α}刺激产生的平均EOG以PGE₂为最高。雌鱼和雄鱼嗅上皮对3种提取液的敏感性大小依次为贮精

囊提取液>精巢提取液>卵巢提取液;对4种人工合成激素的敏感性大小依次为PGE₂>PGF_{2α}>17α-P>17α, 20β-P。

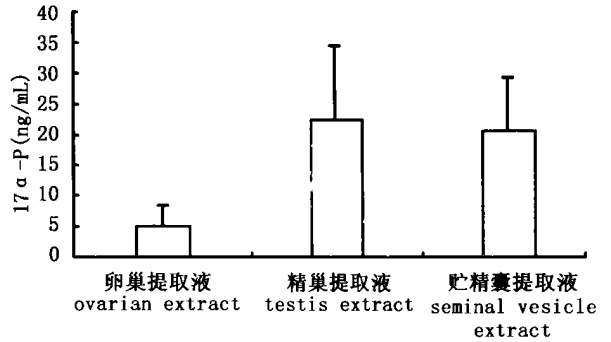


图2 性成熟中华乌塘鳢

3种提取液中17α-P的含量(n=6)

Fig.2 17α-P levels of three extracts in

mature *Bostrichthys sinensis* (n=6)

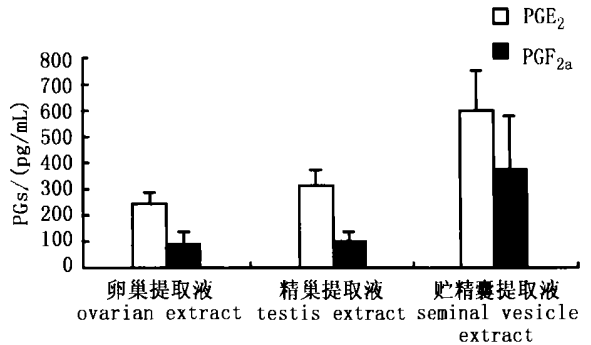


图3 性成熟中华乌塘鳢

3种提取液中PGE₂和PGF_{2α}的含量(n=6)

Fig.3 PGE₂ and PGF_{2α} levels of three extracts in

mature *Bostrichthys sinensis* (n=6)

3 讨论

研究结果表明,除PGF_{2α}实验组外,其他吊挂有性外激素的陶瓷人工产卵管道内的亲鱼总数均多于对照组,而且只有吊挂性外激素的实验组才有亲鱼产卵,提示性外激素在性成熟中华乌塘鳢的生殖过程中起着重要的作用。据赵卫红等报道,在人工产卵管道内放置性成熟大弹涂鱼卵巢、精巢和贮精囊的提取液,有诱导异性进入管道内的作用^[9]。本实验结果显示,吊挂卵巢提取液的管道内雄鱼总数多于雌鱼,而吊挂精巢提取液或贮精囊提取液的管道内雌鱼的总数多于雄鱼,说明性成熟中华乌塘鳢的性外激素对异性的吸引力较强,这种现象和EOG的测定结果一致,即卵巢

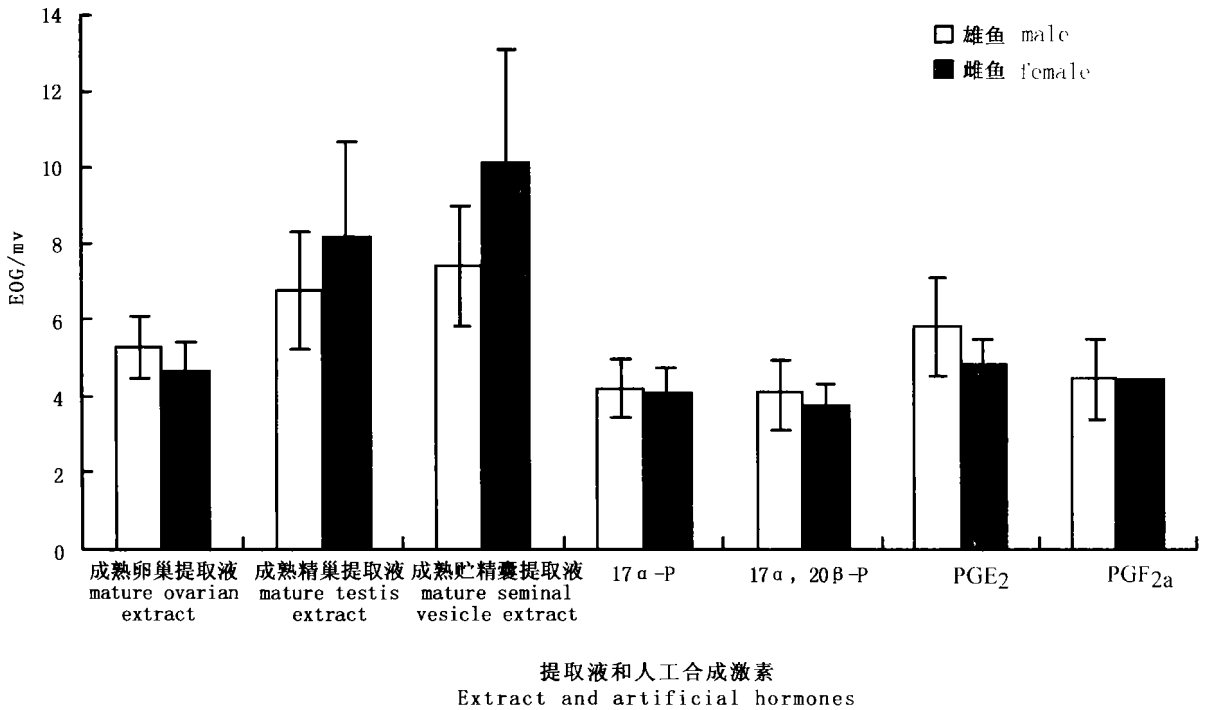


图 4 性成熟中华乌塘鳢对性外激素刺激反应的 EOG(n= 10)

Fig. 4 EOG in response to sex pheromones stimulation in mature *B. sinensis*(n = 10)

提取液刺激所引起的平均 EOG 雄鱼高于雌鱼, 而精巢提取液和贮精囊提取液刺激所引起的平均 EOG 则是雌鱼高于雄鱼。性外激素作用于同种其他个体的机理是性外激素分子先与嗅上皮细胞膜上的相应受体结合, 引起细胞内 cAMP 增加, 使膜对离子的通透性发生变化, 改变膜电阻, 产生嗅感受电位 EOG, 信息经感觉神经传至中枢神经系统, 通过下丘脑-脑垂体-性腺轴的调节使体内相应的性激素含量发生变化, 从而产生一系列的生殖生理过程^[10]。据有关文献报道, 不同种鱼类分泌的性外激素种类有所差异。金鱼和香鱼成熟卵巢分泌的性外激素主要是 17α, 20β-P^[11]; 非洲鲇 (*Claris gariepinus*) 贮精囊释放的性外激素属于性类固醇葡萄糖苷酸, 是一类由 8 种物质组成的混合物^[11]; 另一些鱼类的精巢和卵巢主要释放前列腺素^[12]。本实验结果表明, 在诱发中华乌塘鳢产卵实验中, PGE₂ 实验组的产卵次数最多、产卵量和受精率最高; 在 4 种人工合成的激素中, 雌鱼和雄鱼的嗅上皮对 PGE₂ 的刺激最为敏感, 而且 PGE₂ 在卵巢、精巢和贮精囊提取液中的含量显著高于 PGF_{2a}, 这表明 PGE₂ 是中华乌塘鳢的一种重要的

性外激素。与 PGE₂ 相比, PGF_{2a} 在吸引中华乌塘鳢亲鱼和诱发其产卵中不发挥作用, 但 PGF_{2a} 却是大西洋鲑和泥鳅的一种有效的性外激素, 能引发血清 17α, 20β-P 含量升高^[1,13], 这表明性外激素的作用具有种的特异性。人工合成的 17α-P 和 17α, 20β-P 吸引中华乌塘鳢亲鱼的数量多于对照组, 而且也能诱发雌鱼产卵, 由此可以认为这两种性类固醇激素也可能是中华乌塘鳢的性外激素, 其中 17α, 20β-P 的作用较为明显。17α, 20β-P 在中华乌塘鳢精巢、卵巢和贮精囊提取液中的含量有待今后测定。

参考文献:

- [1] Wang D S, Jiang Z X. Advances in the study of fish sex pheromones[J]. Acta Hydrobio Sin, 2000, 24(3): 282- 288. [王德寿, 江宗秀. 鱼类性外激素的研究进展[J]. 水生生物学报, 2000, 24(3): 282- 288.]
- [2] van Weerd J H, Richter C J J. Sex-pheromone and ovarian development in teleost fish[J]. Comp Biochem Physiol, 1991, 100(3): 517- 527.
- [3] Carolsfeld J, Scott P, Sherwood N M. Pheromone-induced spawning of Pacific herring 2. Plasma steroids distinctive to fish responsive to spawning pheromone[J]. Hormone and Behavior,

- 1997, 31(3): 269- 276.
- [4] van den Hurk R, Resink J W. Male reproductive system as sex-pheromone producer in teleost fish [J]. J Exp Zool, 1992, 261(2): 204- 213.
- [5] Li S, Xiao J P, She Z M, *et al.* The fingerling rearing technique of *Bostrichthys sinensis* [J]. J Shanghai Fish Univ, 1999, 8(1): 48- 52. [李生, 肖锦平, 佘志明, 等. 中华乌塘鳢的育苗技术 [J]. 上海水产大学学报, 1999, 8(1): 48- 52.]
- [6] Chen X Q, Liang, H O, Xiao Y X, *et al.* A preliminary report on the fry breeding of *Bostrichthys sinensis* (Lacepede) [J]. Tropic Oceanol, 1985, 4(1): 88- 89. [陈兴乾, 梁海鸥, 肖耀兴, 等. 中华乌塘鳢人工育苗初报 [J]. 热带海洋, 1985, 4(1): 88- 90.]
- [7] Hong W S, Zhang Q Y, Wang M X, *et al.* Induced ovulation and spawning of mudskipper inside artificial nest [J]. J Tropical Oceanogr, 2001, 20(3): 75- 80. [洪万树, 张其永, 王明雄, 等. 人工管道诱导大弹涂鱼产卵研究 [J]. 热带海洋学报, 2001, 20(3): 75- 80.]
- [8] Chai M J, Pan L P. Effects of heavy metal (Cu^{2+} , Zn^{2+}) on the EOG response of fish (*Tilapia* sp.) [J]. J Xiamen Univ (Nature Science), 1996, 35(1): 94- 99. [柴敏娟, 潘丽婷. 重金属 (Cu^{2+} , Zn^{2+}) 对罗非鱼嗅电图反应的影响 [J]. 厦门大学学报 (自然科学版), 1996, 35(1): 94- 99.]
- [9] Zhao W H, Hong W S, Wu D X, *et al.* Induced maturation and spawning by pheromones in female muskipper (*Bolephthalmus pectinirostris*) [J]. J Oceanogr Taiwan Strait, 2002, 21(3): 284- 291. [赵卫红, 洪万树, 吴鼎勋, 等. 性外激素诱导大弹涂鱼成熟和产卵 [J]. 台湾海峡, 2002, 21(3): 284- 291.]
- [10] Stacey N E, Carlwell J R, Liley N R, *et al.* Hormones as sex pheromones in fish [J]. Persp in Com Endo, 1994, 438- 448.
- [11] Resink J W, Schoonen W G E J, Albers P C H, *et al.* The chemical nature of sex attracting pheromones from the seminal vesicle of the African catfish, *Clarias gariepinus* [J]. Aquac, 1989, 83: 137- 151.
- [12] Stacey N E, Goetz F W. Role of prostaglandins in fish reproduction [J]. Can J Fish Aquat Sci, 1982, 39: 92- 98.
- [13] Ogata H, Kitamura S, Takashima F. E-prostaglandins in the holding water of female loach [J]. Bull Jap Soc Sci Fish, 1993, 59(7): 1259.