

doi: 10.7541/2018.107

利用鱼类性逆转技术创制黄颡鱼XX雄鱼的方法

杨天毅¹ 熊 阳¹ 丹 成¹ 郭稳杰¹ 刘汉勤² 桂建芳^{1,3} 梅 洁¹

(1. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070; 2. 武汉百瑞生物技术有限公司, 武汉 430070;
3. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072)

摘要: 目前黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco* Richardson)生产上使用的母本非常混杂, 成为影响黄颡鱼产业发展的一个突出问题。建立一个优良性状稳定的全雌家系对于全雄黄颡鱼和杂交黄颡鱼的生产尤为重要, 而将XX雌性黄颡鱼逆转为XX雄性黄颡鱼是创制全雌家系中的关键一步。黄颡鱼性染色体连锁分子标记的开发为鉴定XX雄鱼提供了技术支撑。研究使用不同浓度的17 α -甲基睾酮(MT)和芳香化酶抑制剂来曲唑(LZ)处理黄颡鱼鱼苗54d (7—60日龄)。61日龄测量并统计各组鱼的存活率、体长及体重。解剖观察性腺结构, 结合性腺组织切片和性别分子标记分析各组实验鱼中XX鱼性腺发育情况。结果显示: 2种药物对黄颡鱼的存活率影响较小, 与对照组没有显著差异; MT处理的XX性腺为空腔状精小囊结构, 不能逆转为功能性精巢; 适当剂量的LZ可以将XX雌性黄颡鱼性逆转成正常的XX雄鱼, 诱导效果随着剂量的增加而增强。用完全逆转的XX生理雄鱼分别与XX雌鱼和YY雌鱼交配, 能够正常繁殖并具备较好的繁殖能力。研究建立了一种使用芳香化酶抑制剂来曲唑创制黄颡鱼XX雄鱼的方法, 为全雄黄颡鱼的品种改良及新品种的培育奠定了基础。

关键词: 黄颡鱼; 甲基睾酮; 芳香化酶抑制剂; 性逆转; XX雄鱼

中图分类号: S962.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2018)05-0871-08

黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco* Richardson)在分类上隶属于鲶形目, 鲶科, 黄颡鱼属, 是我国重要的淡水经济鱼类之一, 2016年年产量高达41.7 $\times 10^7$ kg^[1]。由于黄颡鱼雄性比雌性生长快, 培育全雄黄颡鱼对于提高黄颡鱼产量有着十分重要的意义。王达等^[2]和丹成等^[3]成功分离得到黄颡鱼X和Y染色体连锁标记, 桂建芳等^[4, 5]开拓出了一条X和Y染色体连锁标记辅助的全雄鱼培育技术路线。基于此, 刘汉勤等^[6, 7]大规模培育出全雄黄颡鱼, 2010年经国家水产原种和良种审定委员会审定为新品种全雄黄颡鱼“全雄1号”。

全雄黄颡鱼“全雄1号”的出现极大推动了黄颡鱼产业的发展。近年来, 亲本超雄鱼繁育系经过多代自交之后发生了退化, 且繁育所用的母本没有经过系统选育, 非常混杂, 制约了全雄黄颡鱼的生产推广。瓦氏黄颡鱼(*Pelteobagrus vachelli* Richardson), 俗称江黄颡, 其生长速度和成活率显著高于黄

颡鱼^[8, 9]。杂交黄颡鱼(黄颡鱼♀ $\times$ 瓦氏黄颡鱼♂)的形态特征和黄颡鱼非常接近, 但其受精率和生长速度明显优于黄颡鱼^[10, 11]。同样, 杂交黄颡鱼繁育所用的母本也非常混杂, 苗种畸形率高。由于子代的很多生长性能是由母本决定的, 建立一个优良性状稳定的全雌配套系对于全雄黄颡鱼和杂交黄颡鱼的生产尤为重要。刘汉勤等^[6]利用人工雌核发育技术, 发现其雌鱼的雌核生殖后代中有96.9%的雌鱼; 由此推测黄颡鱼的性别决定类型是雌性配子同型(XX♀/XY♂)。基于此, 我们设计了一条全雌黄颡鱼配套系的生产技术路线, 通过性逆转技术将XX雌性黄颡鱼逆转为XX雄性黄颡鱼, 然后XX雄性和雌性黄颡鱼繁殖后即可获得大量XX雌鱼^[12]。

人工诱导鱼类性逆转方法主要有2种: 其一是添加外源激素直接改变体内激素水平诱导性逆转, 常见的药物有17 α -甲基睾酮(MT)、11-酮基睾酮(11-KT)、17 β -雌二醇(E2)等; 其二是添加抑制剂药

收稿日期: 2018-01-08; 修订日期: 2018-06-01

基金项目: 国家现代农业产业技术体系特色淡水鱼体系项目(CARS-46)资助 [Supported by the China Agriculture Research System (CARS-46)]

作者简介: 杨天毅(1991—), 男, 土家族, 湖北恩施人; 硕士研究生; 主要从事鱼类遗传育种研究。E-mail: 229001655@qq.com

通信作者: 梅洁, 博士, 教授; E-mail: jmei@mail.hzau.edu.cn

物干扰体内激素与受体结合,降低鱼类性激素水平,例如芳香化酶抑制剂来曲唑(LZ)等。利用MT处理人工诱导黄颡鱼性逆转的研究也曾有报道,但其结果存在争议。姚道霞等^[13]在出苗10d开始使用激素处理过的饵料(激素剂量为20 $\mu\text{g/g}$)喂养黄颡鱼,持续投喂3个月,处理组黄颡鱼中雄性比例高达90.9%。Shen等^[14,15]使用MT和LZ两种药品对黄颡鱼进行转雄处理,处理方法为10日龄至59日龄之间采用连续投喂药物浸泡的丰年虫处理。结果发现,用MT处理的黄颡鱼并没有显著改变其性别比,但所有处理组都诱导出一定比例的间性性腺;而3种浓度的LZ口服处理分别产生了75%、83.3%和75%的雄性。但这些研究过程中并未使用到性染色体连锁的分子标记,不能区分XY和XX雄鱼,故不能确定是否获得XX雄鱼^[13-15]。在本研究中,我们使用不同浓度17 α -甲基睾酮(MT)和来曲唑(LZ)处理黄颡鱼鱼苗,并应用性染色体连锁分子标记,希望探索出XX雌性黄颡鱼转雄的切实可行方法,并获得XX雄鱼。

1 材料与方法

1.1 实验材料、实验动物和实验设计

实验鱼亲本均为湖南田家湖收集的野生黄颡鱼,实验鱼苗为野生亲本经人工授精孵化所得,出膜后3d用丰年虫开口,7日龄进行激素和药物处理实验。在7—29日龄期间,用不同浓度的MT (25和50 $\mu\text{g/L}$)和LZ (100、300和1000 $\mu\text{g/L}$)浸泡丰年虫1h后再投喂。在30—60日龄期间,用对应浓度的MT (25和50 mg/kg)和LZ (100、300和1000 mg/kg)拌入微粒饲料后再投喂(饲料购自湖州亿盛饲料有限公司,主要成分:粗蛋白 $\geq 45.0\%$,粗脂肪 $>5.0\%$,粗纤维 $\leq 6.0\%$,灰分 $\leq 15.0\%$,水分 $\leq 10.0\%$)。MT和LZ溶于95%的乙醇,拌入微粒饲料后于40℃中烘干4h,对照组仅加入95%乙醇。实验共6个组:0 (对照组)、MT₂₅、MT₅₀、LZ₁₀₀、LZ₃₀₀和LZ₁₀₀₀。每组3个平行,每个平行随机放入300尾鱼苗。在7—29日龄期间,鱼苗饲养于60 L的循环水水箱中,每天投喂3次。达30日龄时转入4 m^3 的流水水泥池中,每天投喂2次。在实验期间,水温保持26—28.5℃,溶氧5.5—6.8 mg/L 。每天清理残饵粪便,及时换注新水。黄颡鱼性腺分化的关键时期是8—30日龄,本次实验选择7—60日龄期间连续用药物处理,能够完全覆盖其性腺分化的关键时期^[16]。

61日龄取样鉴定,剩下的鱼转喂正常颗粒饲料(购自正大饲料有限公司,主要成分:粗蛋白 $\geq$

40.0%,粗脂肪 $>5.0\%$,粗纤维 $\leq 10.0\%$,灰分 $\leq 16.0\%$,水分 $\leq 12.0\%$)。每个平行随机抽取30尾鱼,用乌来糖麻醉后测量体长(精确到0.1 mm)、体重(精确到0.01 g),并统计各组存活率。再从中取出15尾进行解剖,观察性腺发育情况。解剖后用Bouin's液固定性腺、拍照、编号留存。再取出性腺置于PFA中继续固定,24h后加入PBS缓冲液(PFA:PBS=1:4),编号后4℃保存。与此同时,剪取尾鳍用于性别分子鉴定。性腺照片编号、固定的性腺编号、尾鳍编号须一一对应。

1.2 基因组DNA的提取

取鳍条0.2 g左右,使用醋酸铵法提取基因组DNA,将DNA溶于100 μL 的超纯水中,4℃保存备用。

1.3 PCR扩增及性别鉴定

性别鉴定的PCR引物来源于Dan等^[3]分离得到的黄颡鱼性染色体连锁标记(XY-F: 5'-GATTG TAGAAGCCATCTCCTTAGCGTA-3'; XY-R: 5'-CATGTAGATCACTGTACAATCCCTG-3')。PCR反应体系为10 μL : 2 $\times$ Es Taq Master Mix (Dye) 5 μL ,上下游引物各0.5 μL (10 $\mu\text{mol/L}$),模版1 μL (50 $\text{ng}/\mu\text{L}$),加ddH₂O补至10 μL 。PCR反应程序为:94℃预变性3min,34个循环(94℃ 30s,59℃ 30s,72℃ 40s),72℃ 5min。PCR反应在T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, 美国)上进行。得到的PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳,再利用凝胶成像系统依据片段长度鉴别出XY和XX。XY为2条带(826和955 bp),XX为一条带(955 bp)。

1.4 性腺组织学观察

将各组鉴定出的XX鱼性腺样本送往谷歌生物技术有限公司做常规石蜡切片,HE染色后在显微镜下观察性腺发育状况、拍照并统计性别比例。

1.5 数据分析

数据均以平均值 $\pm$ 标准误表示,采用SPSS 18.0对所得数据进行单因素方差分析(one-way ANOVA),若差异达到显著水平,则采用Duncan氏法进行多重比较,显著性水平 $P<0.05$ 。

2 结果

2.1 MT和LZ处理对黄颡鱼存活率及生长的影响

利用SPSS软件对6组黄颡鱼(每组3个平行重复)在61日龄时的存活率、体长以及体重进行差异显著性检验(表1)。在7—61日龄处理期间,5个实验组黄颡鱼的存活率与对照组无显著差异;在61日龄时,对照组幼鱼平均体长和3个LZ处理组无显著

差异, 而显著高于2个MT处理组; MT₂₅、MT₅₀、LZ₁₀₀三组幼鱼平均体重与对照组差异显著, 而LZ₃₀₀、LZ₁₀₀₀两组与对照组无显著差异。以上结果说明, MT和LZ对黄颡鱼存活无明显影响, 综合61日龄各组幼鱼平均体长和体重两组数据可得出: MT对黄颡鱼鱼苗生长有明显的抑制作用, 而LZ对其生长的影响不明显。

2.2 MT和LZ处理对XX黄颡鱼性腺发育的影响

61日龄时, MT和LZ处理的黄颡鱼外表均有雄性生殖突, 但不能单一从外观来确定性别。我们将各组黄颡鱼个体通过性别分子标记进行性别鉴定(图1)后进行性腺的组织学观察, 6组实验鱼的性腺发育情况及所占比例结果见表2。61日龄对照组正常卵巢(图2A-B)和正常精巢(图2C-D)的外观结构和组织学观察结果如图2所示。在MT₂₅和MT₅₀处理组的XX黄颡鱼中, 发现其性腺外观结构与普通

表 1 61日龄时不同浓度MT和LZ处理组的存活率、体长及体重统计

Tab. 1 Effects of various doses of MT and LZ on survival rate, total length, and weight at 61 days post fertilization (n=30)

实验组 Experimental group	存活率 Survival (%)	体长Total length (cm)	体重 Weight (g)
0 (Control)	97.10±0.91	5.89±0.23 ^a	3.71±0.39 ^a
MT ₂₅	94.26±0.87	4.32±0.09 ^b	1.57±0.05 ^c
MT ₅₀	95.05±2.41	4.34±0.12 ^b	1.54±0.13 ^c
LZ ₁₀₀	95.06±2.40	5.08±0.17 ^{ab}	2.30±0.24 ^{bc}
LZ ₃₀₀	96.36±1.05	5.58±0.67 ^a	3.14±1.10 ^{ab}
LZ ₁₀₀₀	94.50±0.91	5.21±0.03 ^a	2.64±0.29 ^{abc}

注: 表中同列数据中不同肩注字母表示有显著差异(P<0.05), 相同字母或无字母表示差异不显著(P>0.05); 下同
Note: In the same line, different letter superscripts mean significant differences (P<0.05), and the same letter superscripts or no letter superscripts mean no significant differences (P>0.05); the same applies below

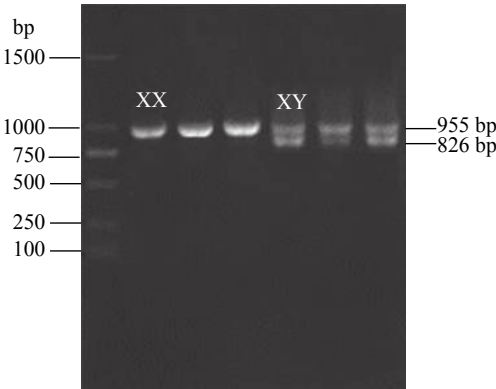


图 1 利用PCR反应鉴定黄颡鱼遗传性别的示意图

Fig. 1 The genetic sex of yellow catfish was identified by polymerase chain reaction (PCR) method with the sex-linked markers

表 2 61日龄不同浓度MT和LZ处理组的XX基因型黄颡鱼的性腺结构统计

Tab. 2 The effects of various doses of MT and LZ on the gonad of XX yellow catfish at 61 days post fertilization (n=15)

实验组 Experimental group	XX与XY 性别比 Sex ratio of XX to XY	不良精巢 (无精小叶) Dysplastic testis without seminiferous lobule (%)	不良精巢 (部分精小叶) Dysplastic testis with part of seminiferous lobule (%)	精巢(完整精小叶) Normal testis with full of seminiferous lobule (%)
0 (Control)	0.67±0.73	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b
MT ₂₅	0.84±0.32	100.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b
MT ₅₀	1.05±0.51	100.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b
LZ ₁₀₀	1.33±0.76	94.47±4.86 ^a	5.57±5.32 ^b	0.00±0.00 ^b
LZ ₃₀₀	0.79±0.62	25.00±26.63 ^b	55.00±3.61 ^a	20.00±18.02 ^{ab}
LZ ₁₀₀₀	0.72±0.25	0.00±0.00 ^b	64.30±8.28 ^a	35.70±5.57 ^a

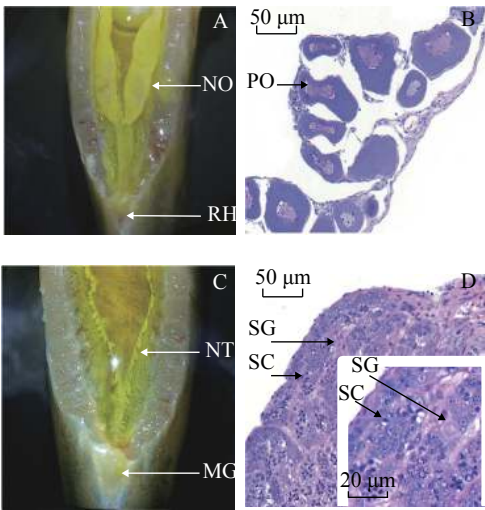


图 2 61日龄对照组正常卵巢和精巢结构

Fig. 2 The phenotype and histology of normal ovary and testis at 61 days post fertilization in the control group

A. Bouin's液固定的XX卵巢形态; B. XX卵巢切片HE染色图片; C. Bouin's液固定的XY精巢形态; D. XY精巢切片HE染色图片; NO: 正常卵巢; RH: 生殖孔; PO: 初级卵母细胞; NT: 正常精巢; MG: 生殖突; SG: 精原细胞; SC: 精母细胞

A. The XX ovary fixed by Bouin's solution; B. Histological analysis of XX ovary; C. The XY testis fixed by Bouin's solution; D. Histological analysis of XY testis; NO: normal ovary; RH: reproduction hole; PO: primary oocyte; NT: normal testis; MG: male genital swelling; SG: spermatogonium; SC: spermatocyte

XX卵巢的宽条型结构明显不同, 与普通XY精巢性状类似但没有精小叶结构(图3A和图3C); 组织切片观察显示MT₂₅和MT₅₀处理组的XX性腺有精小囊结构, 但里面为空腔(图3B和图3D)。结果显示2个MT处理组的黄颡鱼均未成功逆转, 全部表现为发育不良的精巢。

在LZ处理组中, 所有的XX性腺均表现为发育

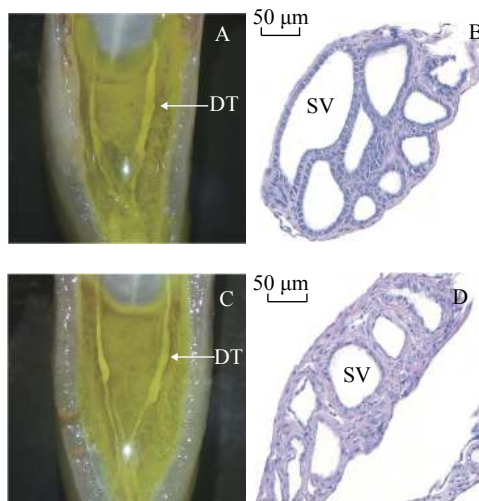


图3 61日龄MT处理组XX黄鲈鱼性腺结构

Fig. 3 Dysplastic testis after MT treatment at 61 days post fertilization

A. Bouin's液固定的MT₂₅组XX不良精巢形态; B. MT₂₅组XX不良精巢切片HE染色图片; C. Bouin's液固定的MT₅₀组XX不良精巢形态; D. MT₅₀组XX不良精巢切片HE染色图片; DT: 不良精巢; SV: 精小囊

A. Dysplastic testis of MT₂₅ group fixed by Bouin's solution; B. Histological analysis of dysplastic testis of MT₂₅ group; C. Dysplastic testis of MT₅₀ group fixed by Bouin's solution; D. Histological analysis of dysplastic testis of MT₅₀ group; DT: dysplastic testis; SV: seminal vesicle

不良的精巢或者完全发育的精巢(表2)。在LZ₁₀₀处理组中,绝大多数只能逆转成没有精小叶的不良精巢(图4A-B),有少部分为有半截正常精小叶的不良精巢(图4C-E)。此外,3个LZ处理组中仅有LZ₃₀₀与LZ₁₀₀₀出现了完全逆转的XX精巢(图4F-G)。LZ₃₀₀与LZ₁₀₀₀出现的完全逆转的XX精巢的比例分别为20.0%和35.7%(表2)。以上结果表明:低浓度的MT (25 mg/kg、50 mg/kg)和低浓度的LZ (100 mg/kg)均不能使XX黄鲈鱼完全性逆转;随着LZ的浓度升高,XX黄鲈鱼无精小叶和有部分精小叶的不良精巢比例逐渐降低,正常精巢的比例逐渐增高,向雄性逆转的趋势逐渐增强。

2.3 一年龄XX生理雄鱼性腺发育及繁殖力

我们对成功逆转的XX生理雄鱼性腺发育进行了追踪,1周年后解剖观察,取成功逆转发育良好的XX精巢和正常XY雄鱼精巢做切片和HE染色比较分析。解剖显示,XX生理雄鱼精巢发育良好,但与XY正常雄鱼精巢相比略显细小(图5A和图5C)。组织学观察显示,XX生理雄鱼精巢发育正常,精小囊中充满了精子,与XY正常雄鱼精巢相比没有明显差异(图5B和图5D)。用完全逆转的XX生理雄鱼分别与XX雌鱼和YY雌鱼交配,统计受精率,并

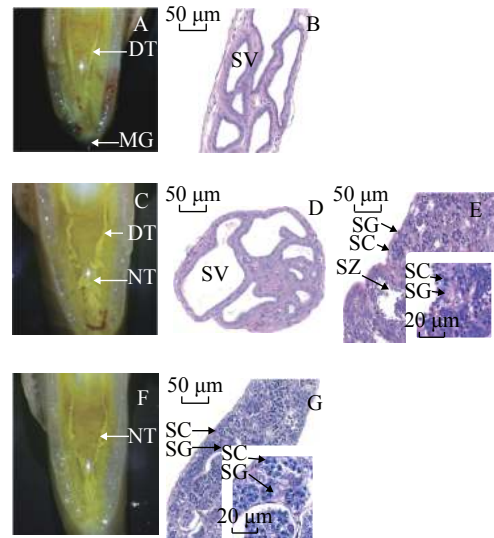


图4 61日龄LZ处理组XX黄鲈鱼性腺结构

Fig. 4 The phenotype and histology of XX gonad after LZ treatment at 61 days post fertilization

A-B. XX不良精巢(无精小叶)的Bouin's液固定和切片HE染色图片; C-E. XX不良精巢(部分精小叶)的Bouin's液固定和切片HE染色图片; D. 无精小叶部位的切片; E. 有精小叶部位的切片; F-G. XX精巢(完整精小叶)的Bouin's液固定和切片HE染色图片; SG: 精原细胞; SC: 精母细胞; SZ: 精子; MG: 生殖突; SV: 精小囊

A-B. The phenotype and histology of dysplastic testis without seminiferous lobule; C-E. The phenotype and histology of dysplastic testis with part of seminiferous lobule; F-G. The phenotype and histology of XX normal testis; SG: spermatogonium; SC: spermatocyte; SZ: spermatozoon; SV: seminal vesicle; MG: male genital swelling

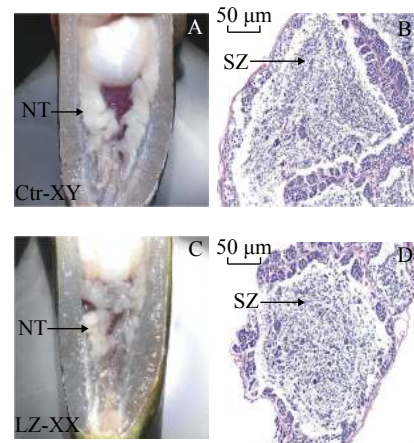


图5 一龄XX生理雄鱼性腺结构

Fig. 5 Gonad structure of one-year-old XX physiological male

A. 对照组XY精巢; B. 对照组XY精巢切片; C. XX生理雄鱼精巢; D. XX生理雄鱼精巢切片; NT: 正常精巢; SZ: 精子

A. XY testis of the control group; B. Histological analysis of the XY testis in the control group; C. Testis of XX physiological male; D. Histological analysis of the XX physiological male testis; NT: normal testis; SZ: spermatozoon

对其子代做性别分子鉴定。结果显示, XX生理雄鱼受精率略低于XY正常雄鱼, 但整体受精状况良好(表3)。对繁育出的子代做性别连锁分子鉴定显示, XX♂×XX♀的子代全为XX, XX♂×YY♀子代全为XY(图6)。以上结果说明, 由LZ处理成功逆转的XX生理雄鱼性腺后期发育稳定, 能够正常繁殖, 并具备较好的繁殖能力。

表3 XX生理雄鱼受精率统计

Tab. 3 The fertilization rate of XX physiological male

实验组 Experimental group	受精率 Fertilization rate (%) XX♀	受精率 Fertilization rate (%) YY♀
Ctrl-XY♂	0.91±0.02 ^a	0.88±0.03 ^a
LZ-XX♂	0.80±0.05 ^b	0.77±0.04 ^b

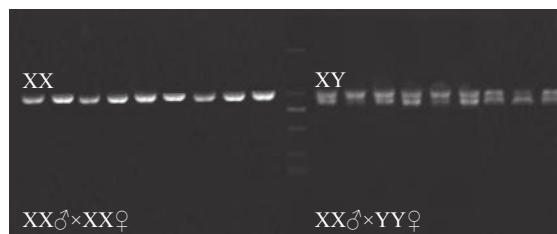


图6 子代性别分子鉴定

Fig. 6 The sex genotype of offspring was identified by PCR method with the sex-linked markers

3 讨论

鱼类的性别决定可分为遗传型性别决定和环境型性别决定两类^[17-20]。但无论哪种性别决定型, 性激素在性别分化或转变过程中都起着至关重要的作用。17α-甲基睾酮(MT)是一种人工合成雄激素, 其诱导鱼类从雌性向雄性逆转的机制有2种观点: (1)MT直接作用于卵巢或对下丘脑-垂体轴产生正反馈作用促使分泌促性腺激素(GTH), 进而诱导原始生殖细胞和性腺向精巢组织分化^[21]; (2)MT通过抑制卵巢中芳香化酶基因(P450 aromatase)表达导致雌二醇(E2)总量降低而引起性逆转^[22]。

MT已被广泛应用在鱼类性逆转的研究中。李广丽等^[23]采用腹部埋植MT的方法处理2龄雌性赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*), 结果发现性腺中卵细胞退化, 精原细胞增殖, 出现大量精母细胞和精子细胞。其他的几种石斑鱼如鲑点石斑鱼(*Epinephelus trimaculatus*)^[24]、黄腹石斑鱼(*Epinephelus marginatus*)^[25]和白纹石斑鱼(*Epinephelus aneus*)^[26]中, MT也被证明能有效促进性逆转。此外, MT也能诱导虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[27]、剑尾鱼(*Xiphophorus helleri*)^[28]、麦穗鱼(*Pseudorasbora parva*)^[29]

和尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)^[30]等鱼类雌性向雄性逆转。姚道霞^[13]在早前报道中表示用MT能使黄颡鱼发生性逆转, 但和大多数此类报道一样, 她的研究中也未使用到性别标记, 因此MT诱导黄颡鱼性逆转的真实效果有待进一步验证。而且Shen等^[14, 15]使用MT (50和100 mg/kg)对黄颡鱼进行转雄处理, 结果发现用MT处理的黄颡鱼并没有显著改变其性别比, 但所有处理组都诱导出一定比例的间性性腺。前期, 我们使用高剂量的MT (200 mg/kg)在相同时期处理黄颡鱼鱼苗, 并未获得功能性XX生理雄鱼。有趣的是经处理过后的黄颡鱼无论是XX还是XY均表现为外有雄性生殖突, 内为卵巢的结构。这种现象也曾有过报道, 用高剂量MT或长时间处理会导致某些鱼类雌性化^[31-33]。解释这种现象的说法为: 从外部摄入的MT等雄性激素在鱼体内被芳构化, 转变成了雌激素; XY雄性个体的内源性雄激素受到摄入的外源性雄激素的干扰而停止合成^[34]。基于此, 我们只设定用2个低浓度的MT处理组(25和50 mg/kg)。

此次实验结果表明用MT处理黄颡鱼对鱼苗的存活率几乎没有影响。低浓度的17α-甲基睾酮能够抑制黄颡鱼鱼苗的生长, 且不能将XX黄颡鱼完全诱导成雄鱼, 这与MT处理大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)^[35]和大梭鱼(*Esox masquinongy*)^[36]的结果相似。同时在2个MT处理组中, 鉴定出来的XY鱼性腺也出现了退化, 精巢全部呈空泡状(结果未显示)。在之前的报道中, 100 mg/kg的MT处理组也出现空泡化精巢^[14, 15]。MT对正常雄性黄颡鱼精巢的空泡化效应可能是由于MT被芳香构化产生雌激素所导致。用200 μg/L MT处理黑头呆鱼(*Pimephales promelas*)后, 雌鱼和雄鱼血清卵黄蛋白原水平都显著升高^[34]。

芳香化酶是雌激素合成过程中的关键因子, 是催化生物体内雄激素向雌激素转化的关键酶和限速酶, 它将芳构化雄烯二酮和睾丸酮分别催化合成为雌酮和雌二醇^[37]; 性腺发育时期的雌雄激素水平比例是由芳香酶决定的^[38]。因此芳香化酶的活性对动物性别分化是至关重要的, 活性低向精巢发育, 活性高则向卵巢发育^[39]。在斑马鱼(*Danio rerio*)中, 将芳香化酶基因cyp19a1a敲除后, 突变体全为雄性^[40]。Letrozole (来曲唑, LZ), 是一种能够有效抑制芳香酶活性的非固醇类抑制剂, 能有效抑制雌激素的合成。使用LZ处理黄颡鱼、暗纹东方鲀(*Taki-fugu obscurus*)、胡子鲇(*Clarias fuscus*)、鲤(*Cyprinus carpio*)、黄姑鱼(*albiflora croaker*)和青鳉(*Oryzias latipes*)等鱼类的幼鱼均能大大提高雄

性率,但均未使用性别标记来鉴定该雄鱼的基因型^[14,15,41—45]。在我们的研究中,结合LZ处理和性别连锁分子标记鉴定的方法,评估LZ在黄颡鱼中是否能有效诱导XX雌鱼向XX雄性性逆转。当LZ剂量达到300 mg/kg时,约20%的XX雌鱼被逆转为能够正常繁殖的生理雄鱼。且随着其LZ剂量的进一步增大,逆转的成功率也随之升高。

在正常情况下,黄颡鱼卵巢分化要早于精巢分化。在13日龄时卵巢便开始出现分化趋势,19日龄就能形成卵巢腔。而精巢分化时间大概在40日龄,直到55日龄才形成精细小管和输精管^[13]。由此可知,在本实验初期,XX雌鱼性腺就已先开始发育,此时促卵泡激素就已开始刺激性腺分泌雌二醇。同时促性腺激素又可以调节芳香化酶基因的表达和芳香化酶的活性来刺激卵巢分泌雌二醇^[46]。在XX黄颡鱼性腺中,当摄入17 α -甲基睾酮后,芳香化酶的活性并未被完全抑制,仍可将体内部分雄激素转化成雌激素,故性腺不能分化成正常精巢。当摄入足够剂量的来曲唑(300和1000 mg/kg)时,鱼苗体内芳香化酶的活性被有效地抑制,导致雄激素转化成雌激素的通路被阻断,鱼体内雌激素合成减少而雄激素大量积累,性腺就可以朝精巢方向分化。由此可以说明黄颡鱼早期雌激素合成对于维持雌性的发育起着至关重要的作用,只要芳香化酶的活性不被有效抑制,17 α -甲基睾酮就不能诱导黄颡鱼逆转。而黄颡鱼转雄的关键在于XX鱼体内能促进生成雌激素的芳香化酶活性是否被抑制。此次实验探索出了有效将XX生理雌性黄颡鱼转化为XX生理雄鱼的诱导方法,为黄颡鱼全雌配套系的构建奠定了基础。

参考文献:

- [1] China Bureau of Fisheries. China Fishery Statistical Yearbook [M]. Beijing: China Agriculture Press. 2017, 24—25 [中华人民共和国渔政局, 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社. 2017, 24—25]
- [2] Wang D, Mao H L, Chen H X, *et al.* Isolation of Y- and X-linked SCAR markers in yellow catfish and application in the production of all-male populations [J]. *Animal Genetics*, 2009, **40**(6): 978—981
- [3] Dan C, Mei J, Wang D, *et al.* Genetic differentiation and efficient sex-specific marker development of a pair of Y- and X-linked markers in yellow catfish [J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2013, **9**(10): 1043—1049
- [4] Gui J F, Zhu Z Y. Molecular basis and genetic improvement of economically important traits in aquaculture animals (review) [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2012, **57**(19): 1719—1729 [桂建芳, 朱作言. 水产动物重要经济性状
- 的分子基础及其遗传改良. 科学通报, 2012, **57**(19): 1719—1729]
- [5] Mei J, Gui J F. Genetic basis and biotechnological manipulation of sexual dimorphism and sex determination in fish (review) [J]. *Science China Life Sciences*, 2014, **44**(12): 1198—1212 [梅洁, 桂建芳. 鱼类性别异形和性别决定的遗传基础及其生物技术操控. 中国科学: 生命科学, 2014, **44**(12): 1198—1212]
- [6] Liu H Q, Cui S Q, Hou C C, *et al.* YY super-male generated gynogenetically from XY female in *Pelteobagrus fulvidraco* (Richardson) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, **31**(5): 718—725 [刘汉勤, 崔书勤, 侯昌春, 等. 从XY雌鱼雌核发育产生YY超雄黄颡鱼. 水生生物学报, 2007, **31**(5): 718—725]
- [7] Liu H, Guan B, Xu J, *et al.* Genetic manipulation of sex ratio for the large-scale breeding of YY super-male and XY all-male yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco* (Richardson)) [J]. *Marine Biotechnology*, 2013, **15**(3): 321—328
- [8] Wang W, Wang F, Zhang D S. Biology of *Pelteobagrus vachelli* [J]. *Inland Fisheries*, 2004, **29**(4): 13—14 [王武, 王峰, 张东升. 江黄颡鱼的生物学. 内陆水产, 2004, **29**(4): 13—14]
- [9] Gan L, Ma X Z, Zhang W B, *et al.* The growth comparison of larvae and juveniles of *Pelteobagrus vachelli* and *Pelteobagrus fulvidraco* [J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2008, **29**(3): 71—74 [甘炼, 马旭洲, 张文博, 等. 瓦氏黄颡鱼和黄颡鱼仔、稚、幼鱼生长的比较. 华南农业大学学报, 2008, **29**(3): 71—74]
- [10] Wang W M, Yan A S, Zhang Z G, *et al.* Hybridization studies of *Pelteobagrus fulvidraco* and *Pelteobagrus vachelli* [J]. *Freshwater Fisheries*, 2002, **32**(3): 3—5 [王卫民, 严安生, 张志国, 等. 黄颡鱼♀与瓦氏黄颡鱼♂的杂交研究. 淡水渔业, 2002, **32**(3): 3—5]
- [11] Wang M B, Chen Q, Chen Y B, *et al.* Hybridization study of yellow catfish and *Pelteobagrus vachelli* [J]. *Modern Agricultural Sciences and Technology*, 2012, **24**: 273—278 [王明宝, 陈强, 陈耀炳, 等. 黄颡鱼与瓦氏黄颡鱼杂交技术研究. 现代农业科技, 2012, **24**: 273—278]
- [12] Mei J, Gui J F. Sexual Size Dimorphism, Sex Determination and Sex Control Breeding in Yellow Catfish [A]. In: Wang H P, Piferrer F, Chen S L (Eds.), *Sex Control in Aquaculture* [C]. Wiley-Blackwell. 2017
- [13] Yao D X. Sex differentiation and hormonal sex reversal of *Pelteobagrus fulvidraco* [D]. Master Dissertation. Harbin: Northeast Forestry University. 2007 [姚道霞. 黄颡鱼性分化及激素诱导性转化研究. 硕士学位论文, 哈尔滨: 东北林业大学. 2007]
- [14] Shen Z G, Fan Q X, Yang W, *et al.* Effects of non-steroidal aromatase inhibitor letrozole on sex inversion and spermatogenesis in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* [J]. *The Biological Bulletin*, 2013, **225**: 18—23

- [15] Shen Z G, Fan Q X, Yang W, *et al.* Effects of 17 α -Methyltestosterone and aromatase inhibitor letrozole on sex reversal, gonadal structure, and growth in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* [J]. *The Biological Bulletin*, 2015, **228**: 108—117
- [16] Park I S, Kim J H, Cho S H, *et al.* Sex differentiation and hormonal sex reversal in the bagrid catfish *Pseudobagrus fulvidraco* (Richardson) [J]. *Aquaculture*, 2004, **232**(1): 183—193
- [17] Baroiller J F, D'cotta H. Environment and sex determination in farmed fish [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2001, **130**(4): 399—409
- [18] Sandra G E, Norma M M. Sexual determination and differentiation in teleost fish [J]. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 2010, **20**(1): 101—121
- [19] Volff J N, Nanda I, Schmid M, *et al.* Governing sex determination in fish: regulatory putsches and ephemeral dictators [J]. *Sexual Development*, 2007, **1**(2): 85—99
- [20] Stelkens R B, Wedekind C. Environmental sex reversal, Trojan sex genes, and sex ratio adjustment: conditions and population consequences [J]. *Molecular Ecology*, 2010, **19**(4): 627—646
- [21] Lee S T, Kime D E, Chao T M, *et al.* In vitro metabolism of testosterone by gonads of the grouper (*Epinephelus tauvina*) before and after sex inversion with 17 alpha-methyltestosterone [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 1995, **99**(1): 41—49
- [22] Kitano T, Takamune K, Nagahama Y, *et al.* Aromatase inhibitor and 17alpha-methyltestosterone cause sex-reversal from genetical females to phenotypic males and suppression of P450 aromatase gene expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2000, **56**(1): 1—5
- [23] Li G L, Liu X C, Lin H R. Effects of 17 α -methyltestosterone on sex reversal in red-spotted grouper, *Epinephelus akaara* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2006, **30**(2): 145—150 [李广丽, 刘晓春, 林浩然. 17 α -甲基睾酮对赤点石斑鱼性逆转的影响. 水产学报, 2006, **30**(2): 145—150]
- [24] Kuo G M, Ting Y Y, Yeh S L. Induced sex reversal and spawning of blue spotted grouper, *Epinephelus fario* [J]. *Aquaculture*, 1988, **74**(1): 113—126
- [25] Glamuzina B, Glavic N, Skaramuca B, *et al.* Induced sex reversal of dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe) [J]. *Aquaculture Research*, 1998, **29**(8): 563—567
- [26] Hasssin S, Monbrison D, Hanin Y, *et al.* Domestication of the white grouper, *Epinephelus aneus*. Growth and reproduction [J]. *Aquaculture*, 1997, **156**(3-4): 305—316
- [27] Zhao W X, Tan Y Q, Peng S B. Sex reversal induce with 17 α -Methyltestosterone in rainbow trout [J]. *Freshwater Fisheries*, 1991, **1**: 3—5 [赵维信, 谈毅奇, 彭士兵. 17 α -甲基睾酮诱导虹鳟性转化. 淡水渔业, 1991, **1**: 3—5]
- [28] Han J, Xu Y, Yu Y M, *et al.* Effects of 17 alpha-Methyltestosterone on the reversal of male resistance in viviparous swordtail fish (*Xiphophorus helleri*) [J]. *Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica*, 2010, **18**(6): 484—488 [韩建, 许言, 余逸敏, 等. 17 α -甲基睾酮对剑尾鱼的影响. 中国实验动物学报, 2010, **18**(6): 484—488]
- [29] Liu S Z, Zhu Y T, Zhao L R. Effects of MT on gonadal histology of *Pseudorasbora parva* [J]. *Journal of Shanxi Agricultural University (Natural Science Edition)*, 2016, **36**(2): 147—152 [刘少贞, 朱玉婷, 赵凌瑞. 17 α -甲基睾酮对麦穗鱼性腺组织学的影响. 山西农业大学学报: 自然科学版, 2016, **36**(2): 147—152]
- [30] Mo Y Y, Lu M X, Yang L P, *et al.* Study on 17 α -Methyltestosterone residues in muscle tissues of Nile tilapia masculinized by 17 α -Methyltestosterone [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2010, **37**(10): 146—148 [莫媛媛, 卢迈新, 杨丽萍, 等. 17 α -甲基睾酮诱导尼罗罗非鱼雄性化后在鱼肌肉内残留研究. 广东农业科学, 2010, **37**(10): 146—148]
- [31] Piferrer F, Donaldson E M. Dosage-dependent differences in the effect of aromatizable and nonaromatizable androgens on the resulting phenotype of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1991, **9**(2): 145—150
- [32] Ankley G T, Jensen K M, Kahl M D, *et al.* Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow (*Pimephales promelas*) [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2001, **20**(6): 1276—1290
- [33] Parrott J L, Wood C S. Fathead minnow lifecycle tests for detection of endocrine-disrupting substances in effluents [J]. *Water Quality Research Journal of Canada*, 2002, **37**(3): 651—667
- [34] Hornung M W, Jensen K M, Korte J J, *et al.* Mechanistic basis for estrogenic effects in fathead minnow (*Pimephales promelas*) following exposure to the androgen 17alpha-methyltestosterone: conversion of 17alpha-methyltestosterone to 17alpha-methylestradiol [J]. *Aquatic Toxicology*, 2004, **66**(1): 15—23
- [35] Arslan T, Phelps R P, Osborne J A. Effects of oestradiol-17 β or 17 α -methyltestosterone administration on gonadal differentiation of largemouth bass *Micropterus salmoides* (Lacepede) [J]. *Aquaculture Research*, 2009, **40**(16): 1813—1822
- [36] Rinchard J, Dabrowski K, Garcia-Abiado M A, *et al.* Uptake and depletion of plasma 17alpha-methyltestosterone during induction of masculinization in muskellunge, *Esox masquinongy*: effect on plasma steroids and sex reversal [J]. *Steroids*, 1999, **64**(8): 518—525
- [37] Haynes B P, Dowsett M, Miller W R, *et al.* The pharmacology of letrozole [J]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, **87**(1): 35—45

- [38] Navarro-Martín L, Blázquez M, Piferrer F. Masculinization of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) by treatment with an androgen or aromatase inhibitor involves different gene expression and has distinct lasting effects on maturation [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2009, **160**(1): 3—11
- [39] Nakamura M, Bhandari R K, Higa M. The role estrogens play in sex differentiation and sex changes of fish [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2003, **28**(1): 113—117
- [40] Yin Y, Tang H, Liu Y, *et al.* Targeted disruption of aromatase reveals dual functions of cyp19a1a during sex differentiation in zebrafish [J]. *Endocrinology*, 2017, **158**(9): 3030—3041
- [41] Wang Q, Guo Z L, Li Y S, *et al.* Effects of letrozole on gonadal differentiation and related gene expression in gonad of *Takifugu obscurus* [J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2012, **47**(5): 16—23 [汪奇, 郭正龙, 李延伸, 等. 来曲唑对暗纹东方鲀性腺分化及相关基因表达的影响. 动物学杂志, 2012, **47**(5): 16—23]
- [42] Li G L, Deng S P, Sun J, *et al.* Effects of aromatase inhibitor letrozole on sex differentiation and related gene expression in *Clarias fuscus* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, **20**(5): 911—917 [李广丽, 邓思平, 孙晶, 等. 芳香化酶抑制剂来曲唑对胡子鲇性腺分化及相关基因表达的影响. 中国水产科学, 2013, **20**(5): 911—917]
- [43] Singh A K, Srivastava P P, Verma R, *et al.* Effect of dietary administration of letrozole and tamoxifen on gonadal development, sex differentiation and biochemical changes in common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. *Reproduction Fertility & Development*, 2015, **27**(3): 449—457
- [44] Yang F. Effect of 17 α -Methyltestosterone and letrozole on the sex differentiation in two croakers [D]. Master Dissertation. Zhoushan: Zhejiang Ocean University. 2017 [阳芳. 17 α -甲基睾酮和芳香化酶抑制剂来曲唑对两种黄姑鱼性腺分化的影响. 浙江海洋大学, 硕士学位论文. 2017.]
- [45] Liao P H, Chu S H, Tu T Y, *et al.* Persistent endocrine disruption effects in medaka fish with early life-stage exposure to a triazole-containing aromatase inhibitor (letrozole) [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2014, **277**(4): 141—149
- [46] Lü S J, Zhang T M, Zhao W. Research advance in gonadotropins gene in fish [J]. *Journal of Biology*, 2017, **34**(3): 82—86 [吕绍巾, 张天民, 赵文. 鱼类促性腺激素基因研究进展. 生物学杂志, 2017, **34**(3): 82—86]

PRODUCTION OF XX MALE YELLOW CATFISH BY SEX-REVERSAL TECHNOLOGY

YANG Tian-Yi¹, XIONG Yang¹, DAN Cheng¹, Guo Wen-Jie¹, LIU Han-Qin², GUI Jian-Fang^{1,3} and MEI Jie¹

(1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 2. Wuhan Bairui Biological Technology Co. Ltd, Wuhan 430070, China; 3. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

Abstract: One of the serious problems in aqua-cultural yellow catfish is that the background of female parents is confused. It is particularly important to establish all-female families for the all-male and hybrid yellow catfish production, in which sex-reversal of XX female to XX male is a key step. Development of sex chromosome-linked markers provides a technical support for the identification of XX males in yellow catfish. In this study, different concentrations of 17 α -methyltestosterone (MT) and aromatase inhibitor letrozole (LZ) were used for 54 days to treat yellow catfish (7 to 60 days post fertilization). The survival rate, body length, and body weight of each group were measured at 61 days after fertilization (61 days post fertilization). Gonadal structure was observed and histologically analyzed in XX individuals that were identified by sex-linked markers. As a result, MT and LZ treatments had no significant effects on the survival rate when compared with the control group. In addition, the XX gonad treated by MT showed seminal vesicles and could not be reversed into functional testis. However, appropriate dose of LZ could induce the sex-reversal of XX female to normal XX male, and the induction effect was enhanced with the increase of dose as well. The XX male could normally mate with XX female and YY female, which demonstrated appropriate reproductive ability. The present study proposed a reliable method to create XX male using the aromatase inhibitor LZ, which lays the foundation for the breed improvement of all-male yellow catfish and cultivation of new varieties of yellow catfish.

Key words: Yellow catfish; 17 α -Methyltestosterone; Aromatase inhibitors; Sex-reversal; XX male