

黄颡鱼XX伪雄鱼诱导与全雌种群规模化繁育

刘娅 于跃 鲁子怡 丁洋 樊启学 沈志刚

INDUCTION OF XX PSEUDO-MALES, AND LARGE-SCALE REPRODUCTION OF ALL-FEMALE POPULATION IN YELLOW CATFISH

LIU Ya, YU Yue, LU Zi-Yi, DING Yang, FAN Qi-Xue, SHEN Zhi-Gang

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7541/2023.2022.0113>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

利用鱼类性逆转技术创制黄颡鱼XX雄鱼的方法

PRODUCTION OF XX MALE YELLOW CATFISH BY SEX-REVERSAL TECHNOLOGY

水生生物学报. 2018, 42(5): 871–878 <https://doi.org/10.7541/2018.107>

高温和皮质醇对黄颡鱼性别分化的影响

EFFECTS OF HIGH TEMPERATURE AND CORTISOL ON SEX DIFFERENTIATION OF YELLOW CATFISH (*TACHYSURUS FULVIDRACO*)

水生生物学报. 2021, 45(1): 106–117 <https://doi.org/10.7541/2021.2020.044>

性类固醇激素对黄颡鱼雌雄生长二态性的影响

EFFECTS OF SEX STEROID HORMONES ON SEXUAL SIZE DIMORPHISM IN YELLOW CATFISH (*TACHYSURUS FULVIDRACO*)

水生生物学报. 2020, 44(2): 379–388 <https://doi.org/10.7541/2020.046>

抗菌肽HB β -C在全雄和杂交黄颡鱼对多子小瓜虫抗性差异中的作用

THE ROLE OF ANTIMICROBIAL PEPTIDE HB β -C IN *ICHTHYOPHTHIRIUS MULTIFILIIS* RESISTANCE IN ALL-MALE AND HYBRID YELLOW CATFISH

水生生物学报. 2021, 45(5): 975–985 <https://doi.org/10.7541/2021.2020.193>

黄颡鱼母本的肠系膜脂肪沉积对繁育性能的影响

THE EFFECT OF MESENTERIC FAT DEPOSITION ON REPRODUCTION PERFORMANCE OF FEMALE PARENT FISH (*PELTEOBAGRUS FULVIDRACO*)

水生生物学报. 2021, 45(6): 1181–1189 <https://doi.org/10.7541/2021.2020.222>

黄颡鱼和杂交黄颡鱼“黄优1号”形态及性腺发育的比较

THE MORPHOLOGY AND GONAD DEVELOPMENT OF *PELTEOBAGRUS FULVIDRACO* AND ITS INTERSPECIFIC HYBRID “HUANGYOU NO. 1” WITH *PELTEOBAGGRUS VACHELLI*

水生生物学报. 2019, 43(6): 1231–1238 <https://doi.org/10.7541/2019.146>

doi: 10.7541/2023.2022.0113

黄颡鱼XX伪雄鱼诱导与全雌种群规模化繁育

刘 娅¹ 于 跃¹ 鲁子怡¹ 丁 洋¹ 樊启学^{1,2} 沈志刚¹

(1. 华中农业大学水产学院, 农业农村部淡水生物繁育重点实验室, 教育部长江经济带大宗水生生物产业绿色发展工程研究中心, 池塘健康养殖湖北省工程实验室, 武汉 430070; 2. 湖北黄优源渔业发展有限公司, 武汉 430299)

摘要: 研究利用3种雄性化因素, 包括17 α -甲基睾酮(MT, 5 mg/kg)、来曲唑(LZ, 300 mg/kg)和高温(33.5℃)联合处理12—65日龄黄颡鱼幼鱼, 并将性成熟的XX伪雄鱼与正常XX雌鱼进行人工繁殖, 开展了全雌黄颡鱼(*Tachysurus fulvidraco*)规模化繁殖与苗种培育工作。研究发现, MT、LZ和高温共同作用可诱导XX黄颡鱼逆转为生理型雄性, 完全性逆转个体运动型精子比例与XY雄鱼无显著性差异, 组织学切片也显示其精巢中存在大量精子细胞, 推测XX伪雄鱼具有正常的繁殖功能。随后, 以XX伪雄鱼为父本, 正常XX雌鱼为母本开展了规模化人工繁殖, 获得了57万尾基因型全部为XX的黄颡鱼苗种, 并将其成功培育成大规格鱼种。在幼鱼60日龄和120日龄时取样发现, 分别有2.8%和12.0%的个体发生了不同程度的雄性化, 推测其可能受到池塘自然高温的影响而发生了性逆转。其余XX雌鱼卵巢发育良好, 来年繁殖季节可作为规模化人工繁殖的雌性亲本。研究成功开展了全雌黄颡鱼规模化繁育工作, 为全雌黄颡鱼规模化繁育体系的建立提供了基础, 也为黄颡鱼新品种选育中雌性选育提供了保障。

关键词: 伪雄鱼; 甲基睾酮; 来曲唑; 雄性化; 全雌种群; 性别控制; 环境友好型; 黄颡鱼

中图分类号: S965.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2022)12-1939-10



水产养殖是“蓝色食品”的主要来源^[1], 是人类蛋白质可持续发展的的重要组成部分, 也是全世界增长速度最快的食品生产领域^[2]。众多水产养殖动物在生长速度与最终规格、繁殖行为与性腺价值、肉质与口味、形态与观赏价值等方面表现出明显的性别二态性(Sexual dimorphism)^[3, 4]。这些表现是水产动物非常重要的养殖性能, 因此, 水产养殖对性别控制具有重大需求。性别控制育种是水产动物遗传育种中最重要的育种方式之一, 单性种群养殖能提高鱼体规格整齐度, 减少不必要的能量消耗, 降低养殖成本, 满足人民对于特定性别性腺的需求, 解决亲本短缺等问题^[5]。全世界淡水养殖品种产值前80位的鱼类中, 超过三分之二的种类对单性种群有需求, 包括鲑鳟类、四大家鱼、罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)、鳊(*Siniperca chuatsi*)、鲮类、加州鲈(*Micropterus salmoides*)等^[6, 7]。在这其中, 部分种类单性种群已经实现规模化生产, 包括

全雌虹鳟、全雄罗非鱼、全雌鳊、全雄黄颡鱼等^[8], 推动了养殖产业的发展。

黄颡鱼(*Tachysurus fulvidraco*)属于鲶形目、鲿科、黄颡鱼属, 在我国分布广泛, 除西部高原及新疆外, 广布于各个水系, 野外资源丰富。其无肌间刺、肉质鲜嫩、经济价值高, 养殖地区已覆盖全国27个省份, 2020年产量达到 56.5×10^7 kg, 全国淡水鱼类养殖产量排名第10位(2021中国渔业统计年鉴)。在过去20余年的规模化养殖过程中, 2010年认定的“全雄1号”(黄颡鱼*T. fulvidraco*♀×YY超雄黄颡鱼*T. fulvidraco*♂)和2019年认定的杂交黄颡鱼“黄优1号”(黄颡鱼*T. fulvidraco*♀×瓦氏黄颡鱼*T. vachelli*♂)两个国家审定新品种极大推动了黄颡鱼养殖产业的稳步增长, 是过去10年时间内产量增长最快(15.0%)的两个淡水养殖种类之一(另一个是加州鲈)。但是目前, 一方面黄颡鱼雌性亲本养殖量极度缩减, 另一方面野生种群不可再作为繁殖亲本,

收稿日期: 2022-03-28; 修订日期: 2022-05-18

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项基金(2662021SCP001); 湖北省自然科学基金(2018CFB215); 国家自然科学基金面上项目(32273122)资助 [Supported by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (2662021SCP001); the Natural Science Foundation of Hubei Province (2018CFB215); the National Natural Science Foundation of China (32273122)]

作者简介: 刘娅(1998—), 女; 硕士研究生; 研究方向为鱼类遗传育种。E-mail: 1582984185@qq.com

通信作者: 沈志刚, 副教授; 研究方向为鱼类遗传育种与繁育。E-mail: zgshen2017@mail.hzau.edu.cn

第三是在黄颡鱼人工繁殖过程中, 雌性亲本死亡率一般高达30%。这三方面的因素, 导致我国黄颡鱼雌性亲本严重不足。因此, 黄颡鱼母本的短缺, 已成为制约黄颡鱼养殖产业发展的最重要因素之一。

当前黄颡鱼母本的获得, 是通过人工繁殖获得XX雌鱼和XY雄鱼混合群体, 在养殖达到50 g左右规格时, 将XY雄鱼通过生殖突出挑出, 留下XX雌鱼继续培育至性成熟。这种生产方式效率低下, 浪费大量池塘、人力和饲料资源, 也不利于新品种选育工作的开展^[9, 10], 亟须建立黄颡鱼全雌种群的生产体系。黄颡鱼性别决定方式属于遗传-环境共同决定类型, 或者更准确地说, 是遗传型性别决定^[11, 12]同时受环境应激影响^[6, 13]。因此, 进行全雌黄颡鱼规模化生产, 首先是要诱导XX遗传型个体性逆转, 批量获得功能性的XX伪雄鱼。早在2013年, Shen等^[14, 15]发现, 来曲唑(Letrozole, LZ)处理可以增加黄颡鱼群体的雄性比例, 推测有XX遗传型个体成功性逆转为XX雄鱼; 而17 α -甲基睾酮(17 α -methyltestosterone, MT)处理没有显著改变雄性比例, 而是诱导了大量间性个体的产生。但是在这个阶段, 黄颡鱼性别特异性分子标记还未见报道, 并不能完全确定性逆转的比例及鉴定出性逆转的个体。此后, 借助黄颡鱼性别特异性分子标记^[12], 杨天毅等^[16]进一步确认了MT处理导致精巢发育异常, 但LZ能诱导XX个体雄性化, 并且部分XX伪雄鱼具备繁殖能力。本研究团队前期发现, 黄颡鱼性别分化关键时期用33.5℃高温处理, 能诱导39.1%的XX遗传型个体雄性化^[6]。这些前期工作, 为黄颡鱼性别控制奠定了重要基础, 但全雌黄颡鱼种群的规模化繁育及其性腺发育情况还未见报道。

为了满足黄颡鱼养殖产业对母本的大量需求, 本研究使用高温、LZ和MT共同作用诱导黄颡鱼性逆转, 获得了具有繁殖能力的XX伪雄鱼, 将其与正常XX母本进行规模化人工繁殖, 获得了57万尾仔鱼; 利用性别特异性分子标记, 鉴定该群体全部为XX遗传型; 组织学结果表明, XX全雌鱼群体91.9%个体卵巢发育正常, 8.1%个体可能受到池塘高温影响而性逆转为XX雄鱼。研究结果将为黄颡鱼产业的健康可持续发展奠定重要基础。

1 材料与方法

1.1 XX伪雄鱼制备

普通黄颡鱼雌鱼与雄鱼来自湖北黄优源渔业发展有限公司选育群体。选取规格一致, 无病无伤且体质健壮的亲本进行人工繁殖, 受精卵出膜后带回华中农业大学水产学院科研基地进行养殖。从

3日龄开始用丰年虫进行投喂, 随后逐步驯食微粒饲料(山东升索渔用饲料研究中心, 主要成分: 粗蛋白质 $\geq 50.0\%$, 粗脂肪 $> 8.0\%$, 粗纤维 $\leq 3.0\%$, 灰分 $\leq 16.5\%$, 水分 $\leq 12.0\%$, 钙 $\leq 5.0\%$, 总磷 $\geq 1.0\%$, 赖氨酸 $\geq 2.0\%$)。

为了诱导雌鱼雄性化, 基于实验室前期研究^[6, 14, 15], 我们采取LZ、MT和高温共同处理黄颡鱼幼鱼。处理条件为300 mg/kg LZ、5 mg/kg MT和33.5℃高温, 处理时间为12至65日龄, 覆盖了整个黄颡鱼性别分化关键时期。高温处理通过加热棒实现, 白天每隔6h测定一次水温, 以保证高温的维持和稳定。激素饲料的制备是通过将LZ与MT溶于95%乙醇溶液, 再将配制好的酒精均匀地喷洒在微粒饲料表面, 放入通风橱中使酒精自然晾干, 从而将激素有效配制至饲料中; 对照组饲料同样用乙醇溶液处理, 所有制备好的饲料均置于4℃条件下备用。对照组养殖水温为(26 $\pm$ 2)℃。饲料与乙醇的比例参照实验室之前的配制比例^[14, 15], 略有调整, 每100 g饲料使用10—30 mL乙醇溶液。实验分处理组与对照组两个组, 每组3个重复, 每个重复500尾鱼。

实验期间鱼苗饲养在360 L的圆形养殖桶中, 12—35日龄期间每天投喂3—5次, 35日龄后每日投喂2次, 每天清理残饵粪便并及时换注清水。所有实验鱼65日龄后投喂未经处理的黄颡鱼商品饲料, 利用加热棒将水温维持在(26 $\pm$ 2)℃。越冬期间(12月至次年2月)自然降温, 水温随自然水温波动, 之后利用加热棒将水温逐步升至(26 $\pm$ 2)℃。此后, 在300日龄至330日龄期间, 利用黄颡鱼性别特异分子标记, 将XX与XY遗传型个体分开, 转移至1600 L圆形养殖桶饲养, 直至性成熟。

1.2 XX伪雄鱼与XX雌鱼人工繁殖及其子代苗种培育

在黄颡鱼繁殖季节, 挑选规格较大、腹部不膨大的XX伪雄鱼作为后备父本; 解剖后将性腺中有乳白色精巢的个体作为繁殖父本。为了避免雌性亲本中Y染色体的掺入, 我们对雌性亲本进行逐尾遗传性别鉴定, 将XY雌鱼筛选剔除, 保证雌性亲本基因型全部为XX。解剖上述获得的XX伪雄鱼, 取乳白色、发育良好的精巢组织进行碾磨; 将达到效应时间的XX雌鱼进行人工挤卵, 按照1.0 g精巢组织与1.5 kg鱼卵的比例人工授精, 在0.3%盐水条件下混合受精, 加滑石粉脱黏, 转入流水孵化桶进行孵化。受精12h后统计受精率(受精卵数/总卵粒数 $\times 100\%$), 出膜后估算孵化率(孵出仔鱼数/受精卵数 $\times 100\%$)。

将出膜后的XX全雌鱼水花转移至水泥池, 暂

养3d,待鱼苗平游后转移至面积为4000 m²、深2.0 m的池塘中进行苗种培育,下塘7d开始驯食人工配合饲料,下塘20d时投喂黄颡鱼商品饲料,开展大规模苗种培育及成鱼养殖。

1.3 遗传型性别鉴定

普通黄颡鱼雌雄亲本及其子代、伪雄鱼及其繁殖的雌性亲本均利用黄颡鱼性别特异性分子标记进行遗传型性别鉴定。采用异丙醇沉淀法快速提取背鳍DNA^[17]。利用Dan等^[12]研发的性别特异分子标记(XY-F: 5'-GATTGTAGAAGCCATCTCCTTAGCGTA-3'; XY-R: 5'-CATGTAGATCACTGTACAATCCCG-3')鉴定每尾鱼的遗传型性别。PCR反应体系为10 μL: 上下游引物各0.5 μL; 模板DNA 1.0 μL; 2×Taq PCR Master Mix 5.0 μL(康为世纪); ddH₂O 3.0 μL。PCR反应程序为: 94℃预变性3min, 34个循环(94℃变性30s, 59℃退火30s, 72℃延伸40s), 72℃延伸5min。扩增完成后,取PCR产物3 μL,以DL2000 marker(康为世纪)作为参照,利用凝胶成像系统依据片段长度鉴别出XX(一条带, 955 bp)与XY(2条带, 分别为826和955 bp)基因型。

1.4 表型性别鉴定与性腺组织学观察

取实验组XX基因型个体繁殖季节(300日龄)性腺组织,从外观上区分雌性、雄性与间性(性腺中同时具有精巢和卵巢组织的个体),雄性与雌性组织分别取精巢、卵巢部分,间性性腺组织取卵巢、精巢与连接部分;随机取池塘养殖XX全雌鱼60日龄和120日龄个体性腺组织,保存于Bouin's液中固定,48h后转入70%乙醇常温保存。性腺组织学处理及样品拍摄参照齐飘飘的处理方法^[18],样品通过梯度乙醇脱水、二甲苯透明和石蜡包埋后,连续切片(切片厚度5—6 μm),用苏木精-伊红染色(HE染色),中性树胶封片,自然晾干。使用连接成像系统(MShot Image Analysis System)的光学显微镜进行性腺组织的观察与拍摄,结合性腺外观,鉴定个体表型性别,判断性腺发育状态。各发育阶段性腺中生殖细胞的鉴别参照本实验室前期对黄颡鱼性别分化及性腺发育的组织学观察研究^[6,9,13—15]。

1.5 XX伪雄鱼与XY雄鱼精子活力比较分析

麻醉后解剖XX伪雄鱼与对照组XY雄鱼,取精巢,将其剪开后收集精液样本,用Hank's平衡液稀释。XX伪雄鱼与XY雄鱼各取3尾,每尾鱼的精液样本进行3次技术性重复。通过计算机辅助精子分析系统(Computer-Aided Sperm Analysis, CASA)对精子活力进行检测,拍摄精子运动过程,统计第2s、4s、6s、8s、10s和12s时3个常用的精子活力运动参数,即平均路径速度(Average Path Velocity,

VAP)、直线运动速度(Velocity Straight Line, VSL)和曲线运动速度(Curvilinear Velocity, VCL),记录每次运动中不同运动类型精子的比例。

1.6 数据分析

实验数据采用SPSS (IBM SPSS Statistics 26)统计软件进行统计学分析,用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行体指标和精子运动参数的差异显著性检验,用 t 检验进行受精率和孵化率的差异显著性检验,分析前进行数据正态性和方差齐性检验,利用Duncan's多重比较确定组间差异的显著性, $P<0.05$ 时表示差异具有统计学意义。文中的数据均以平均值±标准误(mean±SE)表示。

2 结果

2.1 LZ、MT与高温共同处理对XX个体雄性化的影响

通过性别特异分子标记、性腺外部形态与组织学,我们将实验处理组XX遗传型中性别发生逆转和具备繁殖能力的个体分为三种表型,即完全逆转型(性腺完全逆转为精巢,XX伪雄鱼)、多精少卵型(XX间性个体,精巢面积≥50%)与少精多卵型(XX间性个体,精巢面积<50%)。XX伪雄鱼的性腺指数(GSI)显著低于XY雄鱼($P<0.05$),但三种XX伪雄鱼之间 GSI 差异不显著(表1)。实验处理组XY与XX遗传型比例分别为48.0%和52.0%,其中完全逆转型XX比例为8.0%,XX间性个体比例为14.0%。对照组XY与XX遗传型比例分别为46.0%与54.0%,没有观察到性别发生逆转或性腺发育异常的个体。

黄颡鱼繁殖季节期间,对照组XY雄鱼精巢发育至Ⅳ期(图1A),呈乳白色,具有鲶形目鱼类精巢典型的分枝状结构,分枝状结构中精液充盈,剪开精巢有白色精液流出;通过组织切片可观察到大量精小囊结构,其中存在大量精子细胞(图1A1和图1A1')。完全性逆转的XX伪雄鱼精巢发育稍滞后,精巢分枝结构较少,发育至Ⅳ期,乳白色精巢组织中有精液存在(图1B),通过组织学切片观察到精巢中存在大量成熟精子和不同发育时期的精原细胞,精小叶结构异常(图1B1和图1B1')。两种类型XX间性个体中(多精少卵型和少精多卵型),精巢部分有少量分枝状结构,剪开精巢有白色精液流出,通过组织学切片观察到精巢结构中存在大量成熟精子;卵巢部分发育正常,肉眼可见成熟卵粒,卵母细胞中观察到大量卵黄颗粒(图1C和图1D)。

2.2 XX伪雄鱼生殖能力鉴定

为了评估XX雄鱼的生殖能力,我们对发生逆

转的XX个体与XY雄鱼的精子活力进行了比较分析(图2)。结果显示,完全逆转型的XX雄鱼与XY雄鱼在不同精子运动类型、VAP(平均路径速度, Average Path Velocity)、VSL(直线运动速度, Straight Line Velocity)和VCL(曲线运动速度, Curvilinear Velocity)方面均无显著性差异($P>0.05$)。XY雄鱼与完全逆转型XX雄鱼的运动型精子比例显著高于少精多卵型XX个体($P<0.05$)。前进型精子^[19](Progressive, 精子运动参数符合 $VAP>50\text{ }\mu\text{m/s}$, 前进型 $ASL/VAP>80\%$)中,完全逆转型XX雄鱼显著

高于少精多卵型XX个体,而慢速型运动精子^[19](Slow, 精子运动参数符合 $0<VAP<20\text{ }\mu\text{m/s}$ 或 $0<VSL<30\text{ }\mu\text{m/s}$)则在XY雄鱼与多精少卵型XX个体之间存在显著性差异($P<0.05$)。通过对比前进型精子的VAP、VSL和VCL,我们发现所有类型精巢3种运动速度从激活第2秒开始均呈下降趋势。以上结果表明,完全逆转型XX个体和XX间性个体,其精液都具有较好的精子活力。

2.3 全雌黄颡鱼规模化繁育

利用上述具有繁殖能力的XX伪雄鱼共开展了

表1 黄颡鱼性别逆转XX个体与XY雄鱼体指标比较分析

Tab. 1 Comparative analysis of body index of XX pseudo-male and XY male

指标Index	对照组XY♂ CR group XY♂	处理组 XX Treatment group XX genotype		
		完全逆转型	多精少卵型	少精多卵型
全长Total length (cm)	18.23±1.06 ^b	19.80±1.09 ^a	21.20±0.10 ^a	17.49±0.41 ^b
体重Body weight (g)	63.38±13.96 ^a	71.50±10.94 ^{ab}	85.08±1.58 ^{ab}	50.58±3.59 ^b
性腺指数GSI (%)	0.88±0.12 ^a	0.48±0.08 ^b	0.41±0.04 ^b	0.18±0.08 ^b
精巢面积/性腺面积Proportion of testis area (%)	100±0.00 ^a	100±0.00 ^a	70.08±14.38 ^b	13.53±2.56 ^c
性腺特征Gonadal characteristics	只有精巢, 呈乳白色分枝状	只有精巢, 少量分枝结构	精卵并存, 多乳白色精巢	精卵并存, 多卵巢少精巢

注: 对照组与处理组样品数量均为50尾, 其中具有繁殖能力的XX遗传型个体数量分别为完全逆转型 $n=4$, 多精少卵型 $n=2$, 少精多卵型 $n=5$; 每行数据不同上标字母表示显著性差异($P<0.05$)

Note: Sampling numbers for control group (CR) and treatment group are both 50. In XX genotype of treatment group, the number of fertile XX male, including completely sex-reversed XX male, mostly sex-reversed XX male, minorly sex-reversed XX male are $n=4$, $n=2$, and $n=5$, respectively. Different superscript letters in each line indicate significant difference ($P<0.05$)

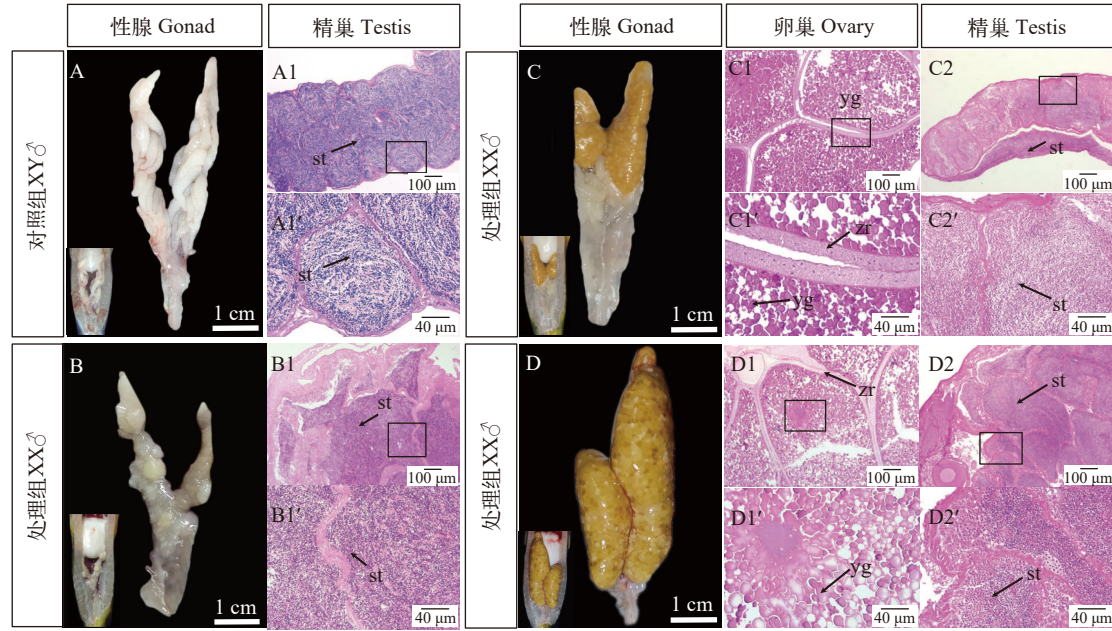


图1 黄颡鱼XX伪雄鱼与XY雄鱼性腺形态及组织学比较

Fig. 1 Gonadal morphology and histology of XX male and XY male in yellow catfish

A. 对照组XY雄鱼精巢; B. XX伪雄鱼完全逆转型精巢; C. XX多精少卵型精巢; D. XX少精多卵型精巢; zr. 放射带; yg. 卵黄颗粒; st. 精子细胞; sg. 精原细胞; sc. 精母细胞; gonad. 性腺; testis. 精巢; ovary. 卵巢
A. XY♂ gonad; B. completely sex-reversed XX male; C. mostly sex-reversed XX male; D. minorly sex-reversed XX male; zr. zona radiate; yg. yolk granules; st. spermatozoa; sg. spermatogonia; sc. spermatocytes

两个批次的全雌黄颡鱼规模化繁育工作, 共孵出57万尾黄颡鱼仔鱼(表2)。以XX伪雄鱼为父本的人工繁殖, 其受精率和孵化率平均分别为58.8%与69.6%, 与正常XY雄鱼为父本的人工繁殖相比, 受精率与孵化率在统计学上均无显著性差异(图3A和图3B)。

为观察夏季自然高温条件下全雌黄颡鱼种群性别分化和性腺发育情况, 我们记录了培育池塘6—9月份每日最高气温, 及幼鱼0至60日龄期间池塘水深1m处的水温。图4A显示, 在黄颡鱼0—60日龄期间, 池塘平均水温为30.6℃, 有8d时间水温超过33.5℃。在幼鱼60日龄和120日龄时, 我们对随机采样所获的共计172尾幼鱼进行了遗传型性别鉴定, 部分结果如图4B所示, 所有幼鱼基因型性别均为XX(图4B)。

对全雌黄颡鱼幼鱼60日龄和120日龄分别进行了取样观察, 发现在60日龄时, 97.2%的个体性腺发育正常, 呈透明棒状, 组织切片观察可发现大量初级卵母细胞, 细胞核与核仁明显(图5)。剩余2.8%的XX个体发生了性逆转, 精巢组织中可见精原细胞和初级精母细胞, 也能观察到精小囊结构。至120日龄时, 100尾幼鱼中88.0%的个体卵巢发育正常, 部分个体可观察到黄色卵粒, 组织学结果显示, 卵母细胞中充满卵黄颗粒, 处在卵黄积累期。剩余12.0%的XX个体发生了性逆转, 其中少部分个体精巢呈典型的分枝状, 组织学观察到大量的精小囊结构, 精巢中观察到精原细胞、精母细胞及非常少量稀疏的精子细胞, 精巢发育异常; 大部分个体精巢呈透明状、无分枝, 组织学观察到精小囊结构异常, 并且存在少量卵母细胞。黄颡鱼幼鱼60日龄时, XX雌鱼全长与体重显著低于XX雄鱼, 但养殖至120日龄时, 两者差异不显著(图5)。

3 讨论

为了解决全国黄颡鱼雌性亲本短缺问题, 我们利用XX雄鱼与XX雌鱼进行全雌黄颡鱼规模化繁育研究, 获得了57万尾基因型全部为XX的黄颡鱼仔鱼, 并将其成功培育成大规格鱼种, 研究结果同时将为杂交黄颡鱼的遗传育种提供丰富的选育材料。

3.1 黄颡鱼XX遗传型个体雄性化

鱼类的性别具有很强的可塑性, 性别分化关键时期易受到外源激素, 包括雌激素、雄激素、性激素合成酶抑制剂、性类固醇受体拮抗剂及具有类似功能的物质的影响, 也易受到环境应激条件, 包括应激性温度(包括高温与低温)、高密度、低溶氧和环境背景色等的影响^[3, 4, 6, 20]。据不完全统计, 为了直接或间接获得单性种群, 全世界有超过27种性逆转药物在超过100种鱼类中使用, 其中在多种经济鱼类中都成功获得了单性种群^[4]。黄颡鱼的性别决定方式主要是遗传型性别决定, 性别决定类型为雄性个体异形, 即XX/XY^[21], 同时明显受到高温等极端环境因素的影响^[6]。因此, 生产全雌黄颡鱼的关键在于成功诱导XX个体雄性化, 以及性逆转XX雄鱼具备正常繁殖能力。

早在2013年, Shen等^[14]首次报道了一种芳香化酶抑制剂LZ(Letrozole, 来曲唑)在黄颡鱼性别分化关键时期(10—59日龄)能显著提高群体雄性率, 并且雄性率与LZ浓度呈现正相关关系。随后, Shen等^[15]又报道了人工合成的雄激素MT(17 α -methyltestosterone, 17 α -甲基睾酮)并不能显著提高黄颡鱼雄性率, 但是诱导了大量间性个体的产生, 精巢呈现大量空腔结构, 生殖细胞稀疏。在这两项研究开展过程中, 黄颡鱼的性别特异分子标记还未开发, 只能通过性别比例和组织学初步判断性逆转的效果。此后, 杨天毅等^[16]也尝试了用MT和LZ对黄颡

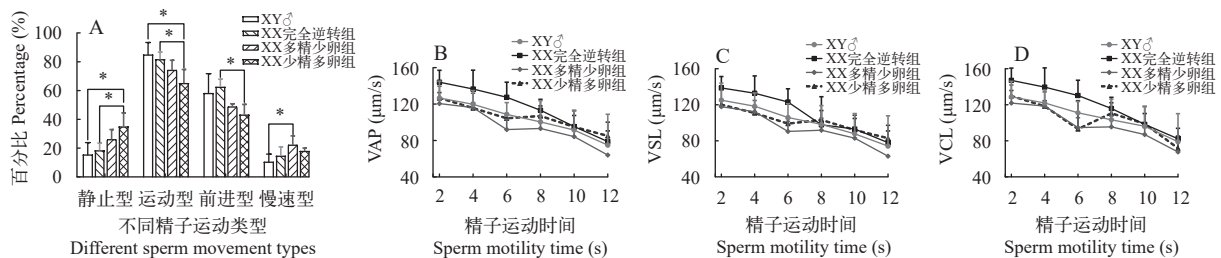


图2 黄颡鱼XX伪雄鱼与XY雄鱼精子活力比较分析

Fig. 2 Comparative analysis of sperm motility between XX pseudo-male and XY male in yellow catfish

A. 对照组XY雄鱼与处理组XX伪雄鱼不同精子运动类型比较; B、C、D. 不同类型精巢前进型精子VAP、VSL、VCL随时间变化曲线; VAP. 平均路径速度; VSL. 直线运动速度; VCL. 曲线运动速度。*表示显著性差异($P < 0.05$)

A. Different sperm movement types between XY of control group and XX pseudo-male of treatment group; B, C, D. VAP, VSL and VCL of progressive sperm; VAP. Average Path Velocity; VSL. Velocity Straight Line; VCL. Curvilinear Velocity. Asterisk (*) indicates significant differences ($P < 0.05$)

鱼幼鱼进行处理,得到了相似的结论。结合黄颡鱼性别特异分子标记^[12],杨天毅等^[16]发现,各浓度MT处理的XX个体性腺为空腔状精小囊结构,没有精子生成,而LZ能将XX个体诱导为正常XX雄鱼,具有较好繁殖能力。此外,Yu等^[6]发现,黄颡鱼性别分化关键时期经3.5周的高温处理(33.5℃)能诱导39.1%的XX个体雄性化,但大部分XX雄鱼精巢发育异常,未观察到精小囊结构,推测大部分个体不具备生殖能力。但是温度处理作为一种环境友好型的性逆转方法,为鱼类性别控制提供了新的思路,有望建立环境友好型性别控制方法。

因此,基于以上前期研究结果,本实验利用三种雄性化因素(包括MT、LZ和高温)进行联合处理,获得了完全逆转型XX和XX间性个体,其中完全逆转型XX占XX基因型的8.0%,比例偏低,但其精巢发育较好,组织学切片能观察到大量精子细胞,推测其具有繁殖能力。到目前为止,所有研究表明,用激素单独处理或联合处理诱导黄颡鱼XX个体性逆转并产生具有正常繁殖能力的XX雄

表 2 全雌黄颡鱼规模化繁殖明细

Tab. 2 Breeding details of the all-female yellow catfish population

序号 Num- ber	XX个体 Number of XX	精巢总重 Testis weight (g)	所用卵重 Ovum weight (g)	卵粒规格 (粒/g) Egg size	卵黄苗(万) Yolk-sac larvae
1	6	0.878	1609	450	10
2	5	1.390	2075	416	47

注:所用XX个体包括完全逆转型和间性XX个体

Note: XX individuals include totally sex reserved and intersex XX individuals

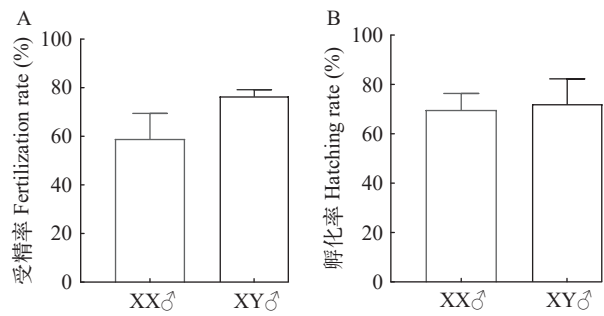


图 3 黄颡鱼XX伪雄鱼和XY雄鱼作为父本的人工繁殖受精率与孵化率比较

Fig. 3 Comparison of fertilization rate and hatching rate between XX pseudo-male and XY male as male parents in yellow catfish

A. XX伪雄鱼与XY雄鱼作为父本人工繁殖受精率比较; B. XX伪雄鱼与XY雄鱼作为父本孵化率比较; XX♂和XY♂分别表示发生了性逆转的XX伪雄鱼和正常XY雄鱼

A. Comparison of fertilization rate between XX pseudo-male and XY male as male parents; Comparison of hatching rate between XX pseudo-male and XY male as male parents. XX♂ and XY♂ represent sex-reversed XX males and normal XY males

鱼比例仍然偏低,这可能与黄颡鱼遗传型性别决定机制较稳定有关。杨天毅等^[16]利用LZ处理黄颡鱼幼鱼,发现1000 mg/kg处理组正常发育精巢比例为35.7%,这个处理剂量对于鱼类性逆转的研究来说是非常高的处理浓度^[8]。此外,上述提到,Yu等^[6]利用高温诱导了39.1%的XX个体雄性化,但性成熟阶段时,绝大部分XX雄鱼精巢发育异常。这些结果表明,黄颡鱼雌性性别决定基因非常强大,大部分个体都对雄性化因素处理有抵抗作用,即便本研究将3种雄性化因素联合进行处理,完全性逆转的比例也不高。需要特别指出的是,MT作为一种人工合成的雄激素,可能不适合诱导黄颡鱼XX个体雄性化。这在多数鱼类中都有相似报道,包括大西洋鲑(*Salmo salar*)^[22]、石斑鱼(*Epinephelus coioides*)^[23]和雌核发育的鲫^[24]等,可能是因为MT在鱼体内代谢过程中被芳构化,从而产生雌激素和雌性化效应^[25,26],也可能是因为外源雄激素的应用导致内源雄激素合成减少^[25,27]。因此应当将MT替换成不能被芳构化的雄激素,比如17 α -methyl dihydrotestosterone。后续研究需要同时考虑降低雌性分化相关基因表达或雌激素水平,同时提高雄性分化相关基因表达或雄激素水平,从而提高XX完全雄性化效率。

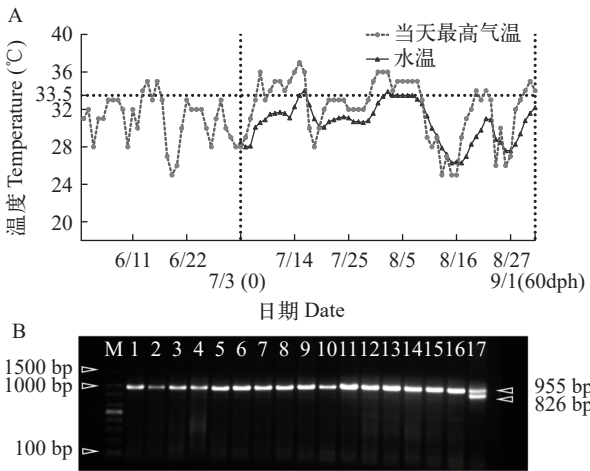


图 4 池塘养殖温度记录及全雌黄颡鱼种群基因型性别鉴定

Fig. 4 Pond temperature records and genotypic sex identification of the all-female yellow catfish population

A. 当地6—9月份气温和全雌黄颡鱼种群0—60日龄池塘水温记录; B. 全雌黄颡鱼基因型鉴定电泳图(X-955bp; Y-826bp); 1—16为一条带,基因型为XX. 17为对照XY基因型; M. DNA marker

A. The local highest air temperature from June to September and pond water temperature; B. Genotypic sex identification by using sex-linked markers in all-female yellow catfish population (X-955 bp; Y-826 bp); 1—16. XX genotype; 17. control XY genotype; M. molecular ladder

3.2 XX伪雄鱼个体的繁殖能力

黄颡鱼性别特异分子标记未报道时, Shen等^[14, 15]发现LZ处理可以增加黄颡鱼群体雄性比例, 推测有XX遗传型个体成功性逆转为XX伪雄鱼; 此后, 齐飘飘等^[13]借助性别特异性分子标记, 发现黄颡鱼在高温或皮质醇处理后, 部分XX伪雄鱼表现出雄性第二性征, 性腺出现典型精小叶结构, 少数能观察到精子细胞。杨天毅等^[16]利用高浓度LZ投喂黄颡鱼可诱导XX个体雄性化, 部分XX伪雄鱼具备繁殖能力。以上研究为黄颡鱼的雄性化奠定了重要基础, 但未曾对性逆转所得XX伪雄鱼的繁殖能力做出评估。

精子运动速度、持续时间和运动类型是判断精液质量和受精率高高低的主要参数^[28], 运动精子和前进型运动精子百分比可以说明精子样本质量总体概况^[29]。Senior等^[30]对激素诱导的伪雄鱼(基因型雌鱼)和正常雄鱼之间精子特征进行了系统综述, 经大量数据分析后发现, 伪雄鱼与正常雄鱼在排精量、运动精子百分比或持续时间等方面无显著差异, 推测在不同性别决定类型鱼类中, 伪雄鱼可能具备与遗传型雄鱼相当的繁殖能力, 这对于全雌种群生产至关重要。例如, 七带石斑鱼(*Epinephelus septemfasciatus*) 和橙点石斑鱼(*Epinephelus coioides*) 在MT诱导性逆转后, 运动精子百分比与对照

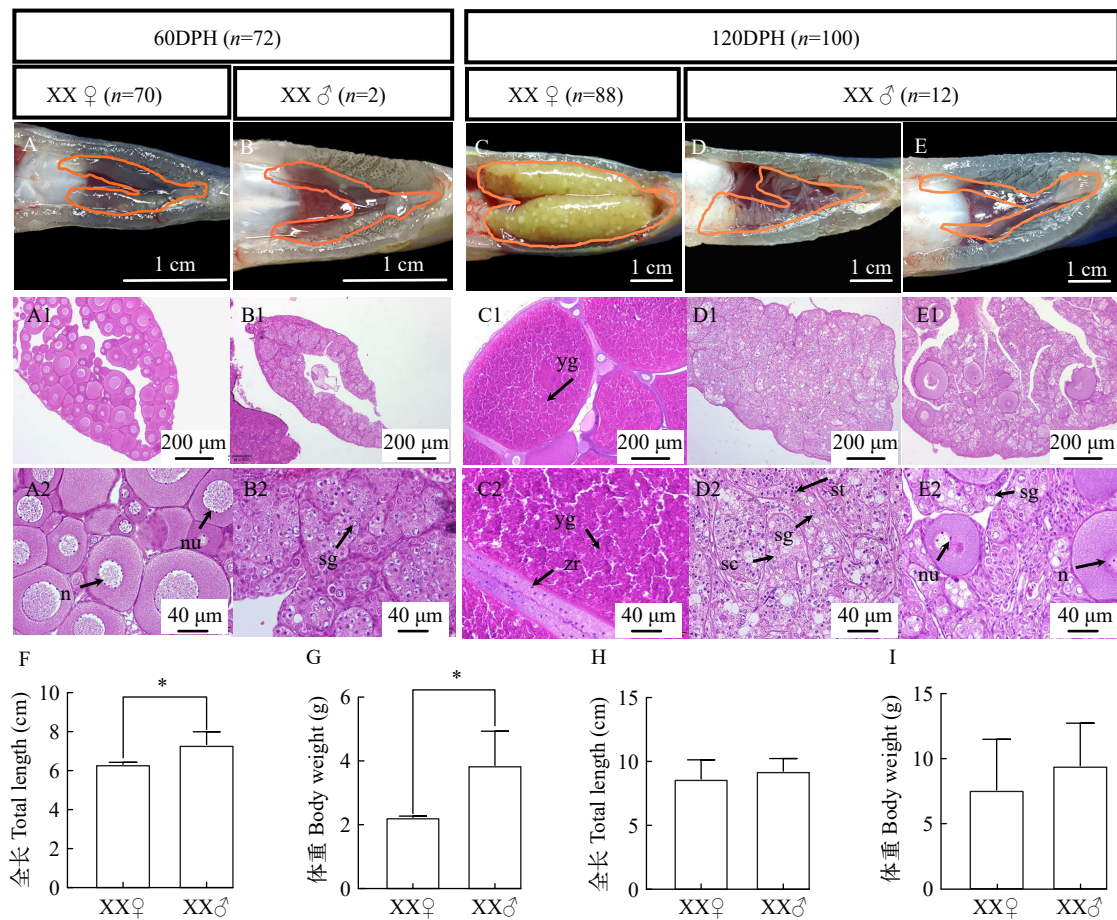


图5 池塘高温期培育的XX雌鱼与性逆转XX雄鱼性腺与生长比较分析

Fig. 5 Comparison of gonadal histology and growth performance of XX female and sex-reversed XX male of pond-raised yellow catfish population during high temperature phase

A, A1, A2. 60日龄正常发育的XX雌鱼; B, B1, B2. 60日龄XX雄鱼; C, C1, C2. 120日龄正常发育的XX雌鱼; D, D1, D2. 120日龄精巢有分枝状结构的XX雄鱼; E, E1, E2. 120日龄精巢无分枝状结构的XX雄鱼; F, G. 60日龄XX雌鱼与XX雄鱼全长与体重比较; H, I. 120日龄XX雌鱼与XX雄鱼全长与体重比较; n. 细胞核; nu. 核仁; zr. 放射带; yg. 卵黄颗粒; sg. 精原细胞; sc. 精母细胞; st. 精子细胞。DPH. 日龄; * 表示显著性差异 ($P < 0.05$); 性逆转数据首次报道于Yu等^[37]

A, A1, A2. normal developed XX female at 60 DPH; B, B1, B2. sex reversed XX male at 60 DPH; C, C1, C2. normal developed XX female at 120 DPH; D, D1, D2. XX male with dendroid testis at 120 DPH; E, E1, E2. XX male without dendroid testis at 120 DPH; F, G. total length and body weight of XX female and XX male at 60 DPH; H, I. total length and body weight of XX female and XX male at 120 DPH; n. nucleus; nu. nucleolus; zr. zona radiate; yg. yolk granules; sg. spermatogonia; sc. spermatocytes; st. spermatozoa. Asterisk (*) indicates significant differences ($P < 0.05$). Data for sex reversal is first reported in Yu, et al.^[37]

雄鱼无异,精子浓度相似,最终受精率与孵化率也无统计学差异^[31-34]。本实验结果与前人描述相似,完全性逆转的XX伪雄鱼与XY雄鱼不同精子运动类型间无统计学差异($P>0.05$),XX伪雄鱼的完全逆转型中,前进型精子运动能力甚至略高于XY雄鱼(图2),说明黄颡鱼伪雄鱼可能与遗传型雄鱼的生殖性能相当^[30]。需要特别指出的是,本实验中,激素诱导的性逆转个体中存在大量XX间性个体,这表明诱导效率未达到理想状态,但是这些个体的精巢部分也具备授精能力。总之,开展全雌黄颡鱼规模化繁育的核心是如何高效获得完全性逆转的,具备授精能力的XX伪雄鱼。

3.3 XX全雌黄颡鱼规模化繁育

黄颡鱼2020年全国产量达 56.5×10^7 kg,属于小型鱼类,产量的持续增长对亲本数量的需求不断增长。黄颡鱼属于分批产卵鱼类,为了提高产卵率和产卵量,通常催产剂的剂量较其他鱼类高,且腹部挤压力度较大,对雌性亲本损伤大,死亡率达50%以上,即便是操作规范的繁殖场,母本催产后死亡率也通常高达30%。加上全雄黄颡鱼和杂交黄颡鱼养殖的普及,雌性亲本严重缺乏。按照当前黄颡鱼产量和苗种存活率估算,全国每年黄颡鱼母本需求量达 1×10^6 kg。因此,开展全雌黄颡鱼规模化繁育对黄颡鱼产业健康可持续发展意义深远,也对黄颡鱼新品种选育至关重要。

本研究首次利用MT、LZ和高温诱导的XX伪雄鱼为父本开展全雌黄颡鱼规模化繁育,其受精率和孵化率分别为58.8%与69.6%,获得了基因型为XX的全雌黄颡鱼仔鱼57万尾。全雌黄颡鱼苗种在池塘中生长情况良好,对60日龄和120日龄共计172尾鱼随机取样分析发现,92%XX雌鱼性腺发育正常。120日龄时,卵巢已发育至卵母细胞成熟期,卵巢呈黄棕色,肉眼可见大量颗粒状卵粒(图5C)。组织学结果显示,XX雌鱼的卵粒中卵黄物质持续增加,卵黄颗粒相互融合。这一卵巢发育水平比齐飘飘等^[13]在黄颡鱼雌鱼120日龄时观察到的初级卵母细胞发育更快,与王凌宇等^[9]报道的300日龄黄颡鱼卵巢呈现的结果相似,预计在良好池塘培育条件下,该批次全雌黄颡鱼中较大个体在来年繁殖季节能作为母本开展繁殖和选育工作。以上结果表明,通过性逆转的XX伪雄鱼与正常XX雌鱼进行人工繁殖,可实现全雌黄颡鱼的规模化生产。本研究结果为全雌黄颡鱼繁育体系的建立提供了重要基础。

3.4 环境应激对黄颡鱼全雌种群性别分化的影响

在本研究中,由于XX伪雄鱼在室内养殖系统中养殖,生长速度较池塘慢,导致全雌黄颡鱼繁育

工作延后,水花下塘时正值湖北地区高温期,全雌黄颡鱼性别分化期间(12—45日龄)水温较高。在60日龄和120日龄时取样发现,分别有2.8%和12.0%的个体发生了不同程度的雄性化,与此前Yu等^[6]报道的33.5℃高温诱导XX个体性逆转相似,性逆转个体的组织学结构也与Yu等^[6]报道的极为相似。在全雌黄颡鱼0—60日龄期间,池塘平均水温为30.6℃,期间有8d时间水温超过33.5℃,推测黄颡鱼幼鱼受高温影响而发生性逆转。因此,要获得基因型和遗传型为雌鱼的全雌黄颡鱼群体,应当避免池塘高温期间开展苗种培育。另一方面,也可能是XX伪雄鱼后代性逆转的临界温度阈值降低,从而在池塘高温条件下发生了雄性化。在罗非鱼和半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)中,与遗传雄性的后代相比,由温度反转伪雄鱼繁殖的后代在高温下表现出更高的转雄率,其后代在常温状态下也可能会发生自然性逆转^[35,36]。当然,也可能是两方面共同作用的结果。因此需要更深入研究XX伪雄鱼子代发生性逆转的遗传学与表观遗传学机制,从而更有效地开展全雌黄颡鱼繁育工作。

从另一方面来讲,温度诱导的雄性化,为环境友好型性别控制技术体系的建立提供了基础。全世界重要经济鱼类的单性种群生产体系中,绝大部分要使用性类固醇激素或类似物,其残留或代谢产物对自然环境存在潜在的负面影响,这种生产方式不符合水产养殖绿色发展的大方向。因此,环保型单性种群的生产方法亟待建立。后续我们将进一步研究池塘高温培育条件下产生的XX伪雄鱼,分析其繁殖能力,为黄颡鱼环境友好型性别控制技术体系的建立提供依据。

参考文献:

- [1] Gephart J A, Henriksson P J G, Parker R W R, et al. Environmental performance of blue foods [J]. *Nature*, 2021, **597**(7876): 360-365.
- [2] FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Presented at the Sustainability in Action, Rome, 2020.
- [3] Shen Z G, Wang H P. Molecular players involved in temperature-dependent sex determination and sex differentiation in teleost fish [J]. *Genetics Selection Evolution*, 2014, **46**(1): 26.
- [4] Wang H P, Shen Z G. Book chapter: Sex Control in Aquaculture: Concept to Practice [M]//Wang H P, Piferer F, Chen S L, et al (Eds.), Sex Control in Aquaculture. John Wiley & Sons, Ltd., UK. 2018: 1-34.
- [5] Senior A M, Lim J N, Nakagawa S. The fitness consequences of environmental sex reversal in fish: a quantita-

- tive review [J]. *Biological Reviews*, 2012, **87**(4): 900-911.
- [6] Yu Y, Chen M, Qi P P, *et al.* High temperature-induced masculinization in yellow catfish *Tachysurus fulvidraco*: A potential approach for environmental-friendly mono-sex production [J]. *Aquaculture*, 2021(534): 736263.
- [7] Fisheries and Aquaculture Software. FishStatJ - Software for Fishery and Aquaculture Statistical Time Series [M]. FAO Fisheries and Aquaculture Department, 2021.
- [8] Wang H P, Piferrer F, Chen S L, *et al.* Sex Control in Aquaculture [M]. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK, 2018: 429-825.
- [9] Wang L Y, Qi P P, Chen M, *et al.* Effects of sex steroid hormones on sexual size dimorphism in yellow catfish (*Tachysurus fulvidraco*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2020, **44**(2): 379-388. [王凌云, 齐飘飘, 陈敏, 等. 性类固醇激素对黄颡鱼雌雄生长二态性的影响 [J]. *水生生物学报*, 2020, **44**(2): 379-388.]
- [10] Shen Z G. Study on sex control and sex-determining mechanism in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* and bluegill sunfish *Lepomis macrochirus* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2014: 37-67. [沈志刚. 黄颡鱼与蓝鳃太阳鱼性别控制及性别决定机制研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2014: 37-67.]
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] Qi P P, Chen M, Yu Y, *et al.* Effects of high temperature and cortisol on sex differentiation of yellow catfish (*Tachysurus fulvidraco*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2021, **45**(1): 106-117. [齐飘飘, 陈敏, 于跃, 等. 高温和皮质醇对黄颡鱼性别分化的影响 [J]. *水生生物学报*, 2021, **45**(1): 106-117.]
- [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**(1): 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**(2): 108-117.
- [16] Yang T Y, Xiong Y, Dan C, *et al.* Production of XX male yellow catfish by sex-reversal technology [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2018, **42**(5): 871-878. [杨天毅, 熊阳, 丹成, 等. 利用鱼类性逆转技术创制黄颡鱼XX雄鱼的方法 [J]. *水生生物学报*, 2018, **42**(5): 871-878.]
- [17] Green M R, Sambrook J. Precipitation of DNA with isopropanol [J]. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2017(8): pdb.prot093385.
- [18] Qi P P. Effects of high temperature and cortisol on sex differentiation of yellow catfish (*Tachysurus fulvidraco*) [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2020. [齐飘飘. 高温和皮质醇对黄颡鱼性别分化的影响 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2020.]
- [19] Su Z H, Mei J, Tian J S, *et al.* Effects of leucine on sperm motility of yellow catfish during periods of autumn breeding [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2019, **38**(4): 71-76. [苏子豪, 梅洁, 田进松, 等. 亮氨酸对秋繁时黄颡鱼精子活力的影响 [J]. 华中农业大学学报, 2019, **38**(4): 71-76.]
- [20] Shen Z G, Wang H P. Book chapter: Environmental Sex Determination and Sex Differentiation in Teleosts—How Sex Is Established [M]//Wang H P, Piferrer F, Chen S L, *et al.* (Eds.), Sex Control in Aquaculture. John Wiley & Sons, Ltd., UK. 2018: 85-115.
- [21] Mei J, Gui J F. Sexual Size Dimorphism, Sex Determination, and Sex Control in Yellow Catfish [M]//Wang H P, Piferrer F, Chen S L, *et al.* (Eds.), Sex Control in Aquaculture. John Wiley & Sons, Ltd., UK. 2018: 495-507.
- [22] Brown M S, Evans B S, Afonso L O B. Genotypic female Atlantic salmon (*Salmo salar*) immersed in an exogenous androgen overexpress testicular-related genes and develop as phenotypic males [J]. *Aquaculture*, 2021, **545**(15): 737216.
- [23] Wang Q, Huang M, Peng C, *et al.* MT-feeding-induced impermanent sex reversal in the orange-spotted grouper during sex differentiation [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, **19**(9): 2828.
- [24] Luo K, Xiao J, Liu S, *et al.* Massive production of all-female diploids and triploids in the crucian carp [J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2011, **7**(4): 487-495.
- [25] Thirumalai A, Yuen F, Amory J K, *et al.* Dimethandrolone Undecanoate, a Novel, Nonaromatizable Androgen, Increases PINP in Healthy Men Over 28 Days [J]. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2021, **106**(1): e171-e181.
- [26] Zerulla M, Länge R, Steger-Hartmann T, *et al.* Morphological sex reversal upon short-term exposure to endocrine modulators in juvenile fathead minnow (*Pimephales promelas*) [J]. *Toxicology Letters*, 2002, **131**(1/2): 51-63.
- [27] 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 17 α -methyltestosterone: conversion of 17 α -methyltestosterone to 17 α -methylestradiol [J]. *Aquatic Toxicology*, 2004, **66**(1): 15-23.
- [28] Tesfay H H, Sun Y, Li Y, *et al.* Comparative studies of semen quality traits and sperm kinematic parameters in relation to fertility rate between 2 genetic groups of breed

- lines [J]. *Poultry Science*, 2020, **99**(11): 6139-6146.
- [29] Zuchowicz N, Daly J, Bouwmeester J, *et al.* Assessing coral sperm motility [J]. *Scientific Reports*, 2021, **11**(1): 61.
- [30] Senior A M, Johnson S L, Nakagawa S. Sperm traits of masculinized fish relative to wild-type males: a systematic review and meta-analyses [J]. *Fish and Fisheries*, 2016, **17**(1): 143-164.
- [31] Koh I C C, Yokoi K, Tsuji M, *et al.* Cryopreservation of sperm from seven-band grouper, *Epinephelus septemfasciatus* [J]. *Cryobiology*, 2010, **61**(3): 263-267.
- [32] Tian Y, Qi W, Jiang J, *et al.* Sperm cryopreservation of sex-reversed seven-band grouper, *Epinephelus septemfasciatus* [J]. *Animal Reproduction Science*, 2013, **137**(3/4): 230-236.
- [33] Peatpisut T, Bart A N. Cryopreservation of sperm from natural and sex-reversed orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) [J]. *Aquaculture Research*, 2010, **42**(1): 22-30.
- [34] Shu H, Zhang Y, Liu X C, *et al.* Effects of ADSD implantation on endocrine and gonadal development in red-spotted grouper *Epinephelus akaara* [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2006, **52**(2): 316-327. [舒琥, 张勇, 刘晓春, 等. 雄烯二酮对赤点石斑鱼内分泌及性腺发育的影响 [J]. *动物学报*, 2006, **52**(2): 316-327.]
- [35] Chen S, Zhang G, Shao C, *et al.* Whole-genome sequence of a flatfish provides insights into ZW sex chromosome evolution and adaptation to a benthic lifestyle [J]. *Nature Genetics*, 2014, **46**(3): 253-260.
- [36] Baroiller J F, Guiguen Y, Fostier A. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 1999, **55**(7): 910-931.
- [37] Yu Y, Chen M, Lu Z Y, *et al.* High-temperature stress will put the thermo-sensitive teleost yellow catfish (*Tachysurus fulvidraco*) in danger through reducing reproductive [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2022(239): 113638.

INDUCTION OF XX PSEUDO-MALES, AND LARGE-SCALE REPRODUCTION OF ALL-FEMALE POPULATION IN YELLOW CATFISH

LIU Ya¹, YU Yue¹, LU Zi-Yi¹, DING Yang¹, FAN Qi-Xue^{1,2} and SHEN Zhi-Gang¹

(1. Key Laboratory of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture, Engineering Research Center of Green Development for Conventional Aquatic Biological Industry in the Yangtze River Economic Belt, Ministry of Education, Hubei Provincial Engineering Laboratory for Pond Aquaculture, College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 2. Hubei Huangyouyuan Fishery Development Limited Company, Wuhan 430070, China)

Abstract: The shortage of female has impeded the development of aquaculture industry of yellow catfish (*Tachysurus fulvidraco*) in China in recent years. Therefore, large-scale production system of all-female is urgently needed. To produce an all-female population in large-scale of yellow catfish, 12—65 days post-hatching larvae were treated with the combination of three male-promoting factors, 17 α -Methyltestosterone (MT, 5 mg/kg), Letrozole (LZ, 300 mg/kg), and high temperature (33.5°C). XX pseudo-males were mated with normal XX females and large-scale production of all-female population was conducted. Results showed that the combination of MT, LZ, and high temperature-induced masculinization of XX individuals, and the completely sex-reversed XX males displayed a similar percentage of motile sperm with XY males. Histological observation found that there are a large number of spermatids in the testis of XX males, indicating normal reproductive ability. Subsequently, we mate XX males and XX females, produced 570000 genotypic XX larvae, and successfully reared them to large fingerlings in a pond. The results indicated that 2.8% and 12.0% XX individuals reversed to XX males which is probably due to the high temperature during the critical time of sex differentiation in the rearing pond. The ovary developed very well for the rest of XX females and can be used as female parents in the coming spawning season. The current work successfully conducted large-scale production of the all-female population in yellow catfish, and the results will provide an important foundation for the large-scale production system of the all-female population, and important safeguard for female selection in genetic breeding of new varieties.

Key words: XX pseudo-male; 17 α -Methyltestosterone; Letrozole; Masculinization; All-female population; Sex control; Environment-friendly; *Tachysurus fulvidraco*