

异育银鲫性别控制的研究

楼允东 宋天复 王逸妹 魏 华

(上海水产大学, 200090)

邬梅初 徐惠明 王志强

(上海市宝山区水产技术推广站, 201900)

提 要 用含400和800ppm 17 α -甲基睾酮的饲料投饲孵化后3天的异育银鲫仔鱼45天,再用无激素的饲料饲养1年,结果获得了一批性腺呈细线状、难辨雌雄的中性不育鱼。经随机解剖测定,中性不育鱼的比例分别是对照组的3.71和3.40倍;与对照组比较,试验组的平均体重分别增长16%和11%;平均性腺系数分别降低45.5%和24.5%;平均出肉率分别增长6.5%和5.0%。切片观察未发现中性鱼的性腺内有生殖细胞。试验表明,用400和800ppm的甲基睾酮都能导致雄激素阉割而产生中性不育鱼,以前者效果更好。经放射免疫测定,发现试验鱼血清和肌肉中的睾酮含量与对照组无显著差异。

关键词 异育银鲫,中性不育鱼,17 α -甲基睾酮,性别控制,放射免疫测定

鱼类性别控制的研究,对水产养殖来说,具有重要的实用价值。因为许多鱼类雌雄鱼之间的经济性状如生长率和个体大小等存在差异。因此,通过控制性别的方法专门生产全雌或全雄苗种进行单性养殖可以提高经济效益。另外,鱼类的高繁殖力固然可以保证种族繁衍,但大多数鱼类到了产卵繁殖期,会把大部分能量消耗在性腺发育上。生殖期雌鱼的腹腔充满卵巢,充分成熟鲤鱼的卵巢最高可占体重的26%~30%[Jhingran, 1982],这样可食部分就相对减少。因此,如何消除性成熟所带来的不利影响,培育出一种性腺不发育的中性鱼就显得非常有意义。

鱼类性别可用类固醇激素加以控制,其中最常用的雄激素是17 α -甲基睾酮(17 α -methyltestosterone)。据报道,不同浓度的甲基睾酮对鱼类具有不同的生物学效应。低剂量(1-5ppm)可促进鲤鱼和金鱼生长[Lone 和 Matty, 1980; Yamazaki, 1976];中剂量(10~50ppm)会导致金鱼或罗非鱼等由雌性向雄性的完全性逆转[中山大学生物系, 1978; 孙儒泳等, 1978; 魏于生等, 1978; 邬国民等, 1979; 陈本德, 1982; 赵维信等, 1991; 方永强等, 1992; 楼允东, 1992; 钱 晖等, 1993; Guerrero, 1973; Nakamura, 1975; Yamamoto 和 Kajishima, 1968; Nagy 等, 1981];高剂量(1000ppm)则对遗传性雄性罗非鱼产生雌性化效应[Nakamura, 1975]以及对两种性别的青鳉产生雄激素阉割[Yamamoto, 1958]。另外,也有投喂较高剂量雄激素引起虹鳟、草鱼和鲤不育的报道[Boney 等, 1984; Manzoor Ali 和 Satyanarayana Rao, 1989; Sathyanarayana Rao 和 Satyanayana Rao, 1983; Yamazaki, 1983]。

从国外的研究来看,用较高剂量类固醇激素处理可能是抑制性腺发育诱导中性不育鱼的

最有效方法之一,但目前尚处于探索阶段。国内还没有这方面的报道。为此,我们以经济价值高、性成熟期早的异育银鲫为材料,用17 α -甲基睾酮诱发中性不育鱼。

一、材料与方 法

1. 试验用鱼及饲养条件 试验用刚孵化出膜3天的异育银鲫(方正银鲫♀×兴国红鲤♂)仔鱼于1992年4月30日取自上海市浦东新区孙桥特种水产养殖场。仔鱼分3组(即400ppm、800ppm和对照组)进行试验,并分别饲养在3个单体循环水族箱(144cm×65cm×85cm)内。饲养期间水温范围为20-25℃,水体溶解氧在6.5mg/L以上。每天排污一次,每隔3天换水一次。

仔鱼在室内水族箱饲养45天后转移到上海市宝山区水产技术推广站养殖场的3口鱼池内,用不含激素的人工配合饲料继续饲养至次年3月底,饲养条件如表1。

表1 试验鱼放养情况一览表

Table 1 Culture status of experimental fish

池号	组别	面积 (M ²)	容积 (M ³)	放苗数 (尾)	放养密度 (尾/M ³)	捕获数 (尾)	成活率 (%)
1	400ppm	119.9	83.9	500	6.0	277	56.0
2	800ppm	306.7	245.3	1500	6.1	780	53.0
3	对 照	102.2	81.8	500	6.1	188	37.6

2. 激素饲料的配制及投饲 三组鱼使用同一配方的饲料为基础饲料,并机械加工成粒径100、200、300和400 μ m四种规格。按每克饲料400和800 μ g的比例准确称取17 α -甲基睾酮(上海试剂二厂出品),先溶于无水乙醇,再倒入基础饲料中,搅拌均匀,40℃烘干。对照组饲料不添加激素。

每天从08:00至18:00,隔2小时投饲一次。每种粒径的饲料投饲7天。在更换饲料前,先将该饲料与前一种饲料等量混合投饲3天作为过渡。总投饲期为45天。

3. 试验鱼养成后的生物学测定 1993年3月25日,3口鱼池拉网捕捞,全数取回,测定大部分鱼的全长、体长、体重、去内脏重和性腺重等,按下列公式计算出肉率与性腺系数:

$$\text{出肉率}(\%) = \frac{\text{去内脏重}}{\text{体重}} \times 100; \quad \text{性腺系数}(\%) = \frac{\text{性腺重}}{\text{体重}} \times 100.$$

取部分鱼的性腺用 Bouin 氏液固定,石腊包埋,制作连续切片,经 H. E. 染色,供组织学观察。

4. 血清与肌肉中睾酮含量的放射免疫测定 试验鱼在室内水族箱暂养一天后,每组随机取15尾,用高压灭菌注射器从尾动静脉采血。血样置于刻度离心管内,静置4小时后吸取血清于1.5ml塑料离心管,用台式离心机以4000转/分离心10分钟。吸取上清液于离心管内,-30℃下保存备用。

采血后,每组随机取5尾,以灭菌尖头镊子挑取背部肌肉,用剪刀剪碎后装瓶,置于低温冰箱保存备用。测定时,先用乙酸乙酯抽提,取上清液,吹干,然后按处理血清的方法处理之。

用竞争性放射免疫测定法测定血清及肌肉中睾酮含量。睾酮药盒由上海市内分泌研究所提供,具体操作程序按常规。氚标采用 Beckman LS9800型液闪计数器测定。

二、结 果

1. 中性不育鱼的检出 解剖456尾试验鱼的结果,表明三个组中都有中性不育鱼存在。这些中性不育鱼与普通雌雄鱼的外表并无明显差异,但它们的性腺极不发达,呈细线状,不能区别雌雄(图版1-3)。

从表2可以看出,中性不育鱼的比例以400ppm组为最高,占总数的28.75%,800ppm组次之,对照组最低,仅占总数的7.75%;400ppm组中性鱼所占的比例是对照组的3.71倍。

2. 各组鱼平均体长及平均体重的比较 从表2可以看出,两个处理组的平均体长与平均体重均大于对照组。与对照组比较,400ppm组的平均体重增加16%,800ppm组增加11%。表2所示三组鱼平均体长差别不是很大,但三组间差异的显著性检验证明其差异仍比较显著。

表2 17 α -甲基睾酮对异育银鲫生长与性腺发育的影响

Table 2 Effect of 17 α -methyltestosterone on growth and gonadal development of allogynogenetic crucian carp

组别	测定尾数	中性鱼		平均体长(cm) ($\bar{X}\pm SD$)	平均体重(g) ($\bar{X}\pm SD$)	平均性腺系数% ($\bar{X}\pm SD$)		平均出肉率% ($\bar{X}\pm SD$)		备 注
		尾数	(%)			♀	♂	♀	♂	
400ppm	160	46	28.75 (3.71)	10.42 \pm 0.72 (1.04)	35.83 \pm 7.10 (1.16)	13.65 \pm 3.93 (0.73)	1.73 \pm 1.97 (0.36)	79.95 \pm 5.48 (1.08)	90.79 \pm 2.88 (1.05)	雌雄同体2尾 畸形鱼5尾
800ppm	167	44	26.35 (3.40)	10.07 \pm 0.93 (1.01)	34.52 \pm 9.90 (1.11)	15.23 \pm 4.85 (0.81)	3.34 \pm 2.92 (0.70)	77.41 \pm 5.36 (1.04)	91.61 \pm 1.94 (1.06)	雌雄同体1尾 畸形鱼50尾
对照	129	10	7.75 (1 ⁺)	10.01 \pm 0.65 (1 ⁺)	30.98 \pm 6.64 (1 ⁺)	18.80 \pm 4.65 (1 ⁺)	4.78 \pm 0.67 (1 ⁺)	74.39 \pm 4.93 (1 ⁺)	86.55 \pm 3.23 (1 ⁺)	畸形鱼1尾

注:括号内数字是比例,以对照组为1。

3. 各组鱼性腺系数和出肉率的比较 从图1、2和表2不难看出,通过激素处理,各试验组的平均性腺系数都有所降低,而平均出肉率都有所增加,其中以400ppm组尤为明显。例如同是雌鱼,400ppm组的平均出肉率比对照组提高8%,平均性腺系数降低27%。800ppm组的平均出肉率比对照组提高4%,平均性腺系数降低19%。虽然雄鱼在各组中所占比例较小,但从平均性腺系数的比较来看,400ppm组和800ppm组分别比对照组降低64%和30%。可见雌雄鱼经较高剂量的激素处理后,性腺发育都受到严重抑制,性腺系数显著降低,甚至产生性腺不发育的中性鱼,从而导致出肉率的提高。

4. 试验组中性不育鱼与对照组雌鱼出肉率的比较 为进一步验证所得中性不育鱼是否出肉率比雌鱼高,我们比较了400ppm组和800ppm组的中性不育鱼与对照组雌鱼的出肉率(表3),结果表明400ppm组与800ppm组的中性不育鱼的出肉率比对照组分别提高22%和23%。由于异育银鲫是雌核发育鱼类,群体中几乎全是雌鱼,雄鱼很少[俞豪祥,1989],因此,如果用雄激素阉割,将全部雌鱼转变为中性不育鱼,这样就可大大提高出肉率,增加经济效益。

5. 性腺发育的组织学观察 为了进一步探讨试验鱼的性腺发育状况,对部分鱼的性腺作

了组织学观察。图版7所示 C148为对照组雌鱼,卵巢充分发育,性腺系数为16.19%。切片观察其卵母细胞已发育至IV时相末,卵内充满卵黄颗粒,核已偏位。图版8-10所示 M157和 M158为雌雄同体鱼,前者以卵巢为主,后者以精巢为主,性腺系数分别为0.71%和0.80%。切片观察,可见各时相的卵母细胞和成熟的精子束。H166和 H168为中性不育鱼,性腺极不发育,均呈细线状。切片观察,性腺内均未发现任何发育阶段的雄性或雌性的性细胞(图版11-15)。其性腺结构仅仅是包括结缔组织、毛细血管、小动静脉以及仅由2-3个神经细胞聚集而成的神经丛,而无性细胞。由于性细胞没有分化发育,结缔组织得以增生成团块,所以性腺没有形成小叶以及小叶间腔隙的组织学特征。H168的结缔组织增生大于 H166。在增生结缔组织团块的周围是脂肪组织,那些大的空泡状细胞系脂肪细胞(脂肪滴被二甲苯溶解呈空泡状)。

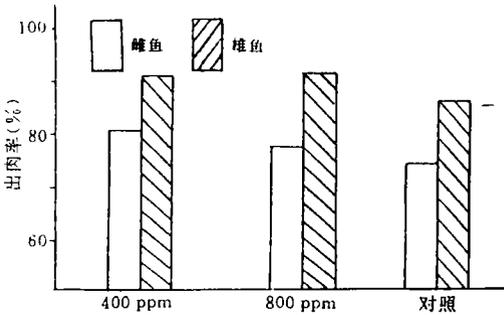


图1 三组鱼出肉率之比较

Fig. 1 Comparison on percentage dress-out in three groups of fish

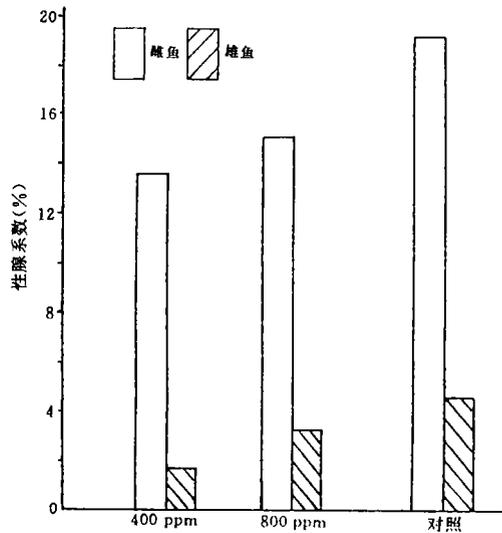


图2 三组鱼性腺系数之比较

Fig. 2 Comparison on gonadosomatic index in three groups of fish

表3 试验组中性不育鱼与对照组雌鱼出肉率的比较

Table 3 Comparison on percentage dress-out between sterile fish in experimental groups and female fish in control group

组别	性别	尾数	平均出肉率% ($\bar{X} \pm SD$)	备注
400ppm	中性	46	90.92 \pm 2.58 (1.22)	1. 出肉率=去内脏重/体重 \times 100; 2. 括号内数字是比率,以对照组雌鱼为1。
800ppm	中性	44	91.42 \pm 2.85 (1.23)	
对 照	雌性	52	74.39 \pm 4.93 (1.0)	

6. 血清和肌肉中睾酮的含量 用激素处理的异育银鲫仔鱼长大后是否会残留激素,这与其可食性有一定关系。为此,我们用高灵敏度和特异性强的放射免疫测定法测定了试验鱼血清和肌肉中的睾酮含量,并同对照组作了比较(表4)。

表4 各组鱼血清和肌肉中睾酮含量的比较
Table 4 Comparison on level of testosterone in serum and muscle
of various groups of fish

组 别	血 清 (ng/ml)	肌 肉 (ng/g)
400ppm	6.58±1.81 (n=10)	0.39±0.16 (n=10)
800ppm	6.52±1.79 (n=8)	0.41±0.06 (n=9)
对 照	6.48±1.79 (n=8)	0.37±0.11 (n=10)

方差分析表明,试验组中血清和肌肉中的睾酮含量均与对照组无显著差异($t < t_{0.05}$)。血清和肌肉中睾酮含量与外源性睾酮注射无关,在较大剂量(800ppm)和一定给药范围(400-800ppm)内,注射外源性激素不会在鱼体内造成累积效应。

三、讨 论

综上所述,用400ppm和800ppm甲基睾酮处理异育银鲫仔鱼后,能大幅度提高中性不育鱼的比例,说明用该法获得中性不育鱼是可行的。中性鱼的最大特点是其不育性,性腺极不发育,呈细线状。这样就可将用于性腺发育的能量全部用于体组织生长,提高饲料转化系数,增加出肉率和生长速度。本试验已证实这一现象。Manzoor Ali和Satyanarayana Rao[1989]用鲤鱼进行的试验也充分说明了这一点。他们用含400ppm甲基睾酮的饲料投饲孵化后1天的鲤鱼仔鱼30天,然后用无激素饲料继续喂养365天,结果中性不育鱼占98.25%,平均体重比对照组提高46.87%;去内脏后体重仅减轻5.59%-7.42%,而对照组则减轻14.95%,鱼片厚度也有明显增加。这是迄今为止所得到的最好结果,但试验规模不大。

本研究中,由于试验组中除中性不育鱼外,仍存在相当比例的雌雄鱼,为了全面地进行考察,我们比较了三个组的平均体长、体重、性腺系数和出肉率。从表2可以看出,除性腺系数外,试验组的各项指标都大于对照组。这说明尽管仔鱼经甲基睾酮处理后,由于种种原因未能全部转变为中性不育鱼,但其性腺发育或多或少受到抑制,比较性腺系数可以验证这一点。无论雌鱼还是雄鱼,试验组的性腺系数都大大低于对照组。

另外,从本试验的结果来看,各项指标都是400ppm组优于800ppm组,而且800ppm组的畸形鱼比例几乎高达30%,而400ppm组仅为3%。畸形包括不同程度的鳃盖不全、鳃外露、胸鳍基部凹陷以及身体扭曲等(图版4-6)。因此,800ppm的激素剂量似乎偏高些,不宜采用。

仔鱼经 17α -甲基睾酮处理后的激素残留问题一直为人们所关注,并有许多学者对此进行

了研究。Goudie 等[1986]分析了摄食17 α -甲基睾酮21天后的性未分化的奥利亚罗非鱼稚鱼的残留量,结果表明,在最后摄食的24小时内,残留量减少90%。Manzoor Ali 和 Satyanarayana Rao[1989]发现在雄激素阉割的中性不育鲤鱼内不含任何残留激素,因此认为食用这种鱼是十分安全的。钱晖等[1993]用放射免疫法测定了性转化罗非鱼在隔水煮沸前后肌肉中的甲基睾酮含量,结果极微量的残留甲基睾酮又被分解和消失了73.7%。本研究资料与上述结果基本一致。由于鱼苗经过激素处理后,绝大部分很快就被转化,即使残留极小部分,经过长达几个月甚至1-2年的饲养,也会从鱼体内消失或经蒸煮后被完全破坏。因此,用激素诱导中性不育鱼对人体不会产生不利影响。

从表2可以看出,对照组中也有一定比例的中性不育鱼出现。究其原因,一是可能与水质有关,因为饲养对照鱼的3号池靠近农户门口,经常有生活污水进入,也许生活污水中的某些化学物质(如洗衣粉等)也有抑制性腺发育的作用;二是可能由于个体间的差异所致。

本研究系上海市科学技术发展基金项目。上海水产大学养殖系1989届赵万兵和林平,国家海洋局东海监测中心沈斌以及上海市宝山区水产技术推广站张剑明等参加了部分试验工作,上海水产大学张敏协助拍摄照片,在此一并致谢。

参 考 文 献

- [1] 中山大学生物系,1978.应用雄性激素诱导罗非鱼雌鱼雄性化的试验简报.中山大学学报(自然科学版),(2):90-99.
- [2] 方永强等,1992.17 α -甲基睾酮对赤点石斑鱼性逆转的影响.水产学报,16(2):171-174.
- [3] 孙儒泳等,1978.国产甲基睾酮对罗非鱼雄性化和生产影响的研究.北京师范大学学报(自然科学版),(4):66-85.
- [4] 陈本德,1982.甲基睾酮诱导鲫鱼雌核发育子代性转化的研究.水产学报,6(2):147-152.
- [5] 邬国民等,1979.应用甲基睾酮诱导莫桑比克非洲鲫鱼雄性化的研究.遗传,1(6):36-39.
- [6] 赵维信等,1991.17 α -甲基睾酮诱导虹鳟性转化.淡水渔业,(1):3-5.
- [7] 俞豪祥,1989.鲫鱼养殖,2-5.上海科学技术出版社.
- [8] 钱 晖等,1993.激素诱导罗非鱼雄性化的试验研究.淡水渔业,23(4):41-42.
- [9] 楼允东,1992.鱼类性别控制研究的进展.上海水产大学学报,1(3~4):168-173.
- [10] 魏于生等,1978.莫桑比克罗非鱼性反转实验研究(一).淡水渔业,(2):18-24.
- [11] Boney, S. E. et al., 1984. Sex reversal and breeding of grass carp. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 113(3):348-353.
- [12] Goudie, C. A. et al., 1986. Tissue distribution and elimination of radiolabelled methyltestosterone fed to sexually undifferentiated blue tilapia. *Aquaculture*, 58(3-4):215-226.
- [13] Guerrero, R. D., 1973. Use of synthetic androgens for sex reversal of *Tilapia aurea*. *Presented at 103rd Ann. Meet. Am. Fish. Soc., Florida*.
- [14] Jhingran, V. G., 1982. Fish and fisheries of India. Hindustan Publishing Corporation, Delhi, 666p.
- [15] Lone, K. P. & A. J. Matty, 1980. The effect on feeding methyltestosterone on the growth and body composition of common carp (*Cyprinus carpio*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 40:407-424.
- [16] Manzoor Ali, P. K. M. and G. P. Satyanarayana Rao, 1989. Growth improvement in carp, *Cyprinus carpio*, sterilized with 17 α -methyltestosterone. *Aquaculture*, 76:157-167.
- [17] Nagy, A. et al., 1981. Sex reversal in carp (*Cyprinus carpio*) by oral administration of methyltestosterone. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 38:725-728
- [18] Nakamura, M., 1975. Dosage-dependent changes in the effect of oral administration of methyltestosterone on gonadal sex differentiation in *Tilapia mossambica*. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, 26:99-108.
- [19] Sathyanarayana Rao H. N. and G. P. Satyanarayana Rao, 1983. Hormonal manipulation of sex in the common carp, *Cyprinus carpio* var. *communis* (Linnaeus). *Aquaculture*, 35:83-88.

- [20] Yamamoto, T., 1958. Artificial induction of functional sex reversal in genotypic females of the medaka (*Oryzias latipes*). *J. Exp. Zool.*, **137**: 227-262.
- [21] Yamamoto, T. and T. Kajishima, 1968. Sex hormone induction of sex reversal in the goldfish and evidence for male heterogamety. *Ibid.*, **168**: 215-222.
- [22] Yamazaki, F., 1976. Application of hormones in fish culture. *J. Fish. Res. Board. Can.*, **33**: 948-958.
- [23] ———, 1983. Sex control and manipulation in fish. *Aquaculture*, **33**: 329-354.

STUDIES ON SEX CONTROL IN ALLOGYNOGENETIC CRUCIAN CARP

Lou Yundong, Song Tianfu, Wang Yimei and Wei Hua

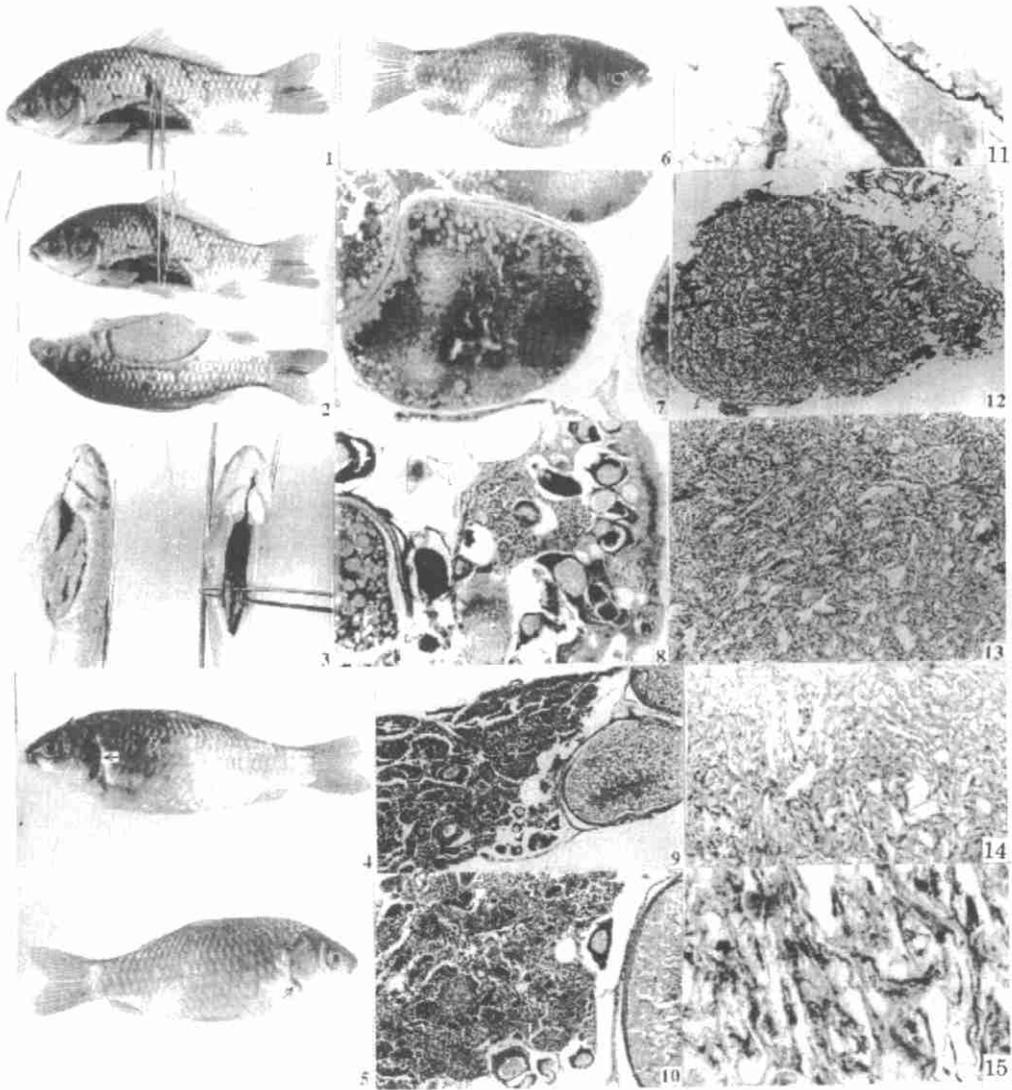
(Shanghai Fisheries University, 200090)

Wu Meichu, Xu Huiming and Wang Zhiqiang

(Fisheries Technical Advice Station of Baoshan District, Shanghai 201900)

ABSTRACT The effect of feeding 17α -methyltestosterone (400 and 800ppm) over a period of 45 days, starting with 3-day-old fry, on growth and gonadal development of allogynogenetic crucian carp was investigated. After the treatment, the tested fish was reared with hormone-free diet for one year. The experimental results are as follows: Oral administration of 17α -MT at 400 and 800 ppm resulted in a high percentage of sterile fish. The ratio of sterile fish was 3.71 times and 3.40 times as high as control group. In comparison with the control group, the mean body weight in two experimental groups increased by 16% and 11%, respectively. The mean gonadosomatic index decreased by 45.5% and 24.5%, and the mean percentage of dress-out increased by 6.5% and 5.0%, respectively. Any germ cells were not been found in the thread-like gonad of sterile fish. The results suggest that oral administration of 17α -methyltestosterone at 400 ppm and 800 ppm to allogynogenetic crucian carp fry would result in androgenic castration and production of sterile fish, especially at the 400 ppm. The level of testosterone in serum and muscle of two experimental groups had no significant difference with control group, indicating the hormone-treated fish do not contain any residual hormones and they are quite safe for human consumption.

KEYWORDS allogynogenetic crucian carp, sterile fish, 17α -methyltestosterone, sex control, radioimmunoassay(RIA)



图版说明

Explanation of plate

1. 中性不育鱼, 示细线状性腺; 2. 中性不育鱼(上)和对照组雌鱼(下), 注意鱼片厚度; 3. 对照组雌鱼(左)和中性不育鱼(右), 示卵巢和细线状性腺; 4. 畸形鱼, 鳃外露(箭头所示); 5. 畸形鱼, 鳃盖不全(箭头所示); 6. 畸形鱼, 身体扭曲; 7. 对照组雌鱼(C148)卵巢切片, 示充分发育的卵母细胞; 8. 雌雄同体鱼(M157)的性腺切片(10×20); 9. 雌雄同体鱼(M158)的性腺切片(10×10); 10. 雌雄同体(M158)的性腺切片(10×20); 11. 中性不育鱼(M166)细线状性腺, 示性腺基质及周围的脂肪组织; 12. 中性不育鱼(H168)细线状性腺的横切(10×4); 13. 图版12的放大(10×10); 14. 图版12的放大(10×20); 15. 图版12的放大(10×100).