

半滑舌鲷养殖群体中自然性逆转伪雄鱼的发现

季相山^{1,2}, 陈松林^{1*}, 马洪雨¹, 姜运良², 杨景峰¹, 董晓丽¹

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

2. 山东农业大学动物科技学院, 山东 泰安 271018)

摘要:利用雌性特异标记遗传性别鉴定技术,对71尾4龄半滑舌鲷的生理和遗传性别进行鉴定,结果显示32尾生理型雌鱼均能扩增出205 bp的雌性特异条带;39尾生理型雄鱼,仅一尾鱼体重显著高于其他雄鱼并扩增出了雌性特异条带,因此这尾鱼遗传上为雌性,是一尾伪雄鱼。对养殖的600尾半滑舌鲷生理雄鱼大规模检测发现,养殖群体自然性逆转伪雄鱼比例为1.66%。对正常雌、雄鱼和1龄自然性逆转伪雄鱼的性腺组织学观察显示,与正常雄鱼相比,伪雄鱼性腺中也有大量的精母细胞,但数量比正常雄鱼的要略少;且未在伪雄鱼的性腺组织中观察到卵母细胞,说明半滑舌鲷性逆转发生在性腺分化期。半滑舌鲷自然性逆转现象的发现有助于解释当前半滑舌鲷养殖群体中雄性率偏高的现象,为半滑舌鲷全雌苗种生产提供了一条新的技术途径,并丰富了鱼类性别分化理论。

关键词:半滑舌鲷;自然性逆转;雌性特异标记;伪雄鱼

中图分类号:S 965.1

文献标识码:A

半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)隶属鲽形目(Pleuronectiformes)舌鲷科(Cynoglossidae)舌鲷属(*Cynoglossus*),有牛舌头、鲷目、鲷米等俗称,具广温、广盐特性,适应性强,营养等级低和生长快等优良性状^[1],是当前海水鱼类养殖的重要品种之一。半滑舌鲷雌、雄个体生长速度差异大,雌性比雄性生长速度快2~4倍,雄鱼生长速度过慢导致半滑舌鲷养殖产量下降、效益降低^[2]。因此,半滑舌鲷全雌苗种生产成为半滑舌鲷养殖业健康、持续、快速发展的关键。半滑舌鲷雌性性染色体异型(ZW),雄性性染色体同型(ZZ)^[3],性逆转的伪雄鱼(ZW)与正常雌鱼(ZW)交配会得到75%的雌性个体和25%的雄性个体(ZZ)^[4]。因此,研究半滑舌鲷自然性逆转现象具有重要的经济意义和理论价值。

在哺乳动物中,性别一旦形成,一般不易逆转。而在鱼类中,除性染色体外,常染色体上的某些基因和一些外部环境因素亦参与性别决定和分

化^[5],这使得鱼类性别具有较大的可塑性,鱼类原发性性别形成后,在激素、温度等作用下可发生逆转,如Rougeot等^[6]采用投喂甲基睾酮(MT)的方式处理40~71 g的河鲈,获得了100%的雄性率。迄今为止,至少在47种鱼类进行了性逆转诱导实验,并取得了良好的效果^[7]。

与人工诱导性逆转相比,自然性逆转鱼类较少,且多见于雌雄同体鱼类,如黄鲈(*Homopterous albus*)^[8]、石斑鱼(*Epinephelus akaara*)^[9]等是雌性先熟的雌雄同体鱼类,黑鲷(*Acanthopagrus schlegeli*)^[10]、尖吻鲈(*Lates calcarifer*)^[11]等是雄性先熟的雌雄同体鱼类。雌雄异体鱼类自然性逆转现象很少见。Otake等^[12]研究发现青鳉(*Oryzias latipes*)存在自然性逆转现象。Zhang等^[13]研究发现,养殖在实验室的部分雌性文昌鱼(*Branchiostoma belcheri tsingtauense*)性反转为功能性的雄鱼。因此,研究自然性逆转现象对于完善性别决定和性别分化理论有重要意义^[14]。

收稿日期:2008-07-31

修回日期:2009-02-27

资助项目:国家“八六三”高技术研究发展计划(2006AA10A403);山东省农业良种工程重大项目;山东省泰山学者工程专项经费

通讯作者:陈松林, Tel:0532-85844606, E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

自然性逆转现象的发现要有遗传性别鉴定技术作强有力的支撑。一直以来,核型分析是鉴定鱼类遗传性别的主要方法,但染色体制作程序较为繁琐,且有些鱼类性染色体还未分化,无法从染色体形态上对其遗传性别进行鉴定^[15]。近年来本实验室利用 AFLP 技术筛选到 7 个半滑舌鳎雌性特异标记,并将其中 2 个转化为 SCAR 标记,建立了半滑舌鳎遗传性别鉴定的 PCR 技术^[16],这为发现半滑舌鳎自然性逆转现象提供了便利。

本研究采用雌性特异标记遗传性别鉴定技术对养殖的半滑舌鳎的遗传性别进行鉴定,旨在揭示半滑舌鳎养殖群体中存在自然性逆转的伪雄鱼,以丰富鱼类性别分化理论;对性逆转伪雄鱼的性腺结构进行了详细观察,揭示半滑舌鳎性逆转伪雄鱼与正常雄鱼性腺组织学差异。

1 材料与方法

1.1 雌、雄半滑舌鳎个体大小比较

71 尾半滑舌鳎 4 龄亲鱼购于海阳市黄海水产有限公司。轻压舌鳎鱼腹部,能挤出精液者为生理雄鱼,能挤出卵者为生理雌鱼。未采出精、卵的舌鳎亲鱼,注射 0.4 ~ 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ LRHA₃,隔 36 ~ 48 h 后继续挤精、卵验证,精液在显微镜下镜检活力^[17]。亲鱼培育池中的 71 尾舌鳎鱼全部取样称重,求得表型雌雄鱼平均体重,并按照体重范围进行分组。

1.2 雌性特异标记检测半滑舌鳎遗传性别

每尾已确认表型性别的舌鳎亲鱼均剪少量鳍条保存于无水乙醇中用于 DNA 提取。DNA 提取方法:取 0.1 g 鳍条置于 200 μL 裂解缓冲液[10 mM Tris-HCl(pH 8.0), 100 mmol/L EDTA(pH 8.0), 0.5% SDS, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 蛋白酶 K, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNA 酶]中,用剪刀剪碎,再加入 300 μL 裂解缓冲液后置于 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中消化过夜。酚-氯仿抽提 2 次,2 倍体积无水冰乙醇沉淀 DNA,70% 乙醇清洗一遍,加入 50 μL 双蒸水溶解 DNA。琼脂糖凝胶电泳检验 DNA 质量,GENEQUANT Pro RNA/DNA 分光光度计测定 DNA 浓度。

按照本实验室建立的半滑舌鳎遗传性别鉴定技术^[16],根据克隆得到的雌性特异 AFLP 序列设计 PCR 引物 CseF205F : 5'-ATCCTGAAGCTCA CTCGTCTGC-3'和 CseF205R : 5'-CCTAAACAA GTGCTGGGTACG-3',利用 PCR 技术对 71 尾

半滑舌鳎亲鱼的遗传性别进行鉴定。PCR 反应体系为 25 μL ,其中包括 10 \times PCR Buffer 2.5 μL , MgCl_2 (25 mmol/L) 1.4 μL ,混合引物(10 pmol/ μL)2.0 μL ,Taq 酶(Tiangen)1 U,DNA 模板 80 ~ 100 ng/ μL ,dNTP(2.5 mmol/L)1.6 μL ,加水至 25 μL 。PCR 反应程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s;60 $^{\circ}\text{C}$ 45 s;72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,34 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分离,有 205 bp 雌性特异条带的个体,其遗传性别为雌;反之为雄。结合表型性别判定结果,确定是否有自然性逆转的个体。

1.3 自然性逆转伪雄鱼的大量检测及其性腺组织学观察

用雌性特异标记遗传性别鉴定技术,对莱州明波水产有限公司 600 尾雄性半滑舌鳎的遗传性别进行鉴定,鉴定方法同前。经鉴定为自然性逆转的个体,取 2 尾并解剖其性腺固定在 Bouin 氏液。固定样品经各级乙醇脱水、二甲苯透明和石蜡包埋,作连续横切切片,切片厚度为 5 ~ 6 μm 。H. E 染色后在 Nikon 光学显微镜下观察和照相。以正常雌雄鱼的性腺石蜡切片作对照。

2 结果

2.1 养殖群体中存在个体较大的表型雄鱼

71 尾半滑舌鳎表型性别鉴定结果显示,表型雄鱼 39 尾,表型雌鱼 32 尾。39 尾半滑舌鳎表型雄鱼平均体重为(0.339 \pm 0.078) kg,最小个体重 0.18 kg,最大个体重 0.585 kg,最大个体明显重于组内其它个体(表 1)。32 尾半滑舌鳎表型雌鱼平均体重为(1.471 \pm 0.214) kg,雌鱼平均体重是雄鱼的 4.33 倍。

2.2 雌性特异标记检测半滑舌鳎遗传性别

在 39 尾表型雄鱼中,仅 1 尾鱼(29 号)扩增出 205 bp 的雌性特异条带,可初步认定这尾鱼遗传上为雌性,是 1 尾自然性逆转的伪雄鱼(图 1),体重明显高于其他雄鱼。32 尾表型雌鱼均能扩增出 205 bp 大小的特异条带(图片未显示),遗传性别鉴定结果与其表型性别完全相符。

2.3 自然性逆转伪雄鱼的大量检测及其性腺组织学观察

雌性特异标记遗传性别检测结果显示,600 尾表型雄鱼中,有 590 尾其遗传性别为雄性,有 1 010 尾其遗传性别为雌性;雌性个体自然性逆转

为雄性的比例为 1.66%，可见半滑舌鳎自然性逆转率较低。自然性逆转伪雄鱼性腺组织学观察结果见图 2，伪雄鱼性腺中也有大量的精母细胞，细

胞形态与正常雄鱼的一致，但数量比正常雄鱼的略少，且未在伪雄鱼的性腺组织中观察到卵母细胞，说明半滑舌鳎性逆转发生在性腺分化期。

表 1 39 尾表型雄鱼和 32 尾表型雌鱼体重比较

Tab. 1 Weight distribution of 39 male and 32 female half-smooth tongue sole

表型雄鱼体重范围(kg) weight distribution of phenotypic male	尾数 no.	平均体重(kg) mean weight	表型雌鱼体重范围(kg) weight distribution of female phenotypic	尾数 no.	平均体重(kg) mean weight
0.2~0.25	6	0.21±0.019	1.0~1.25	4	1.17±0.088
0.25~0.30	5	0.28±0.019	1.25~1.50	16	1.37±0.070
0.30~0.35	8	0.33±0.018	1.50~1.75	8	1.61±0.069
0.35~0.40	13	0.375±1.010	1.75~1.80	2	1.78±0.016
0.40~0.45	6	0.414±0.017	1.80~1.90	0	-
0.55~0.60	1	0.585	1.90~2.0	2	1.94±0.056

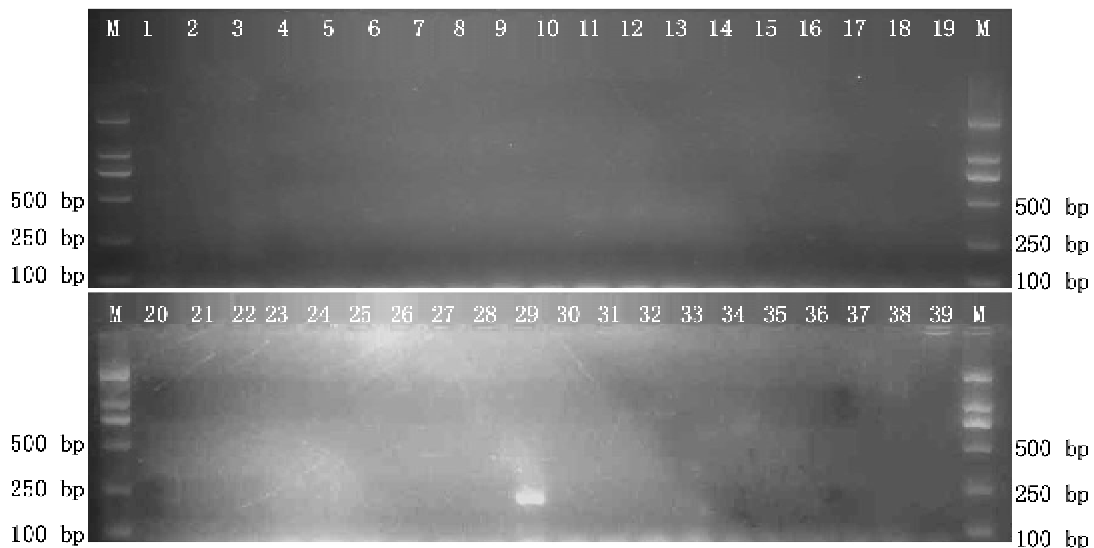


图 1 39 尾表型雄鱼遗传性别鉴定

Fig. 1 Genetic sex identification of 39 phenotypic male half-smooth tongue sole

3 讨论

2 龄前，半滑舌鳎雌性比雄性生长速度快 2~4 倍^[2]，性成熟后，雌雄个体生长速度差异更大，因此，很容易从个体大小上对其性别进行初步判断。2007 年 10 月，在半滑舌鳎繁殖期间，发现 1 尾雄鱼明显大于其它雄性个体，也能产精液，雌性特异标记遗传性别鉴定结果显示，其遗传上是雌性的，确实是一尾自然性逆转的伪雄鱼。

半滑舌鳎雌雄生长差异机制目前还不清楚，其它雌雄生长速度差异较大的鱼类中，如罗非鱼，雄鱼生长激素受体在肝脏等部位的表达量明显大于雌性个体，生长激素表达量雌雄个体间也有差异，因此，生长等相关基因表达的雌雄差异是罗非鱼雌雄生长差异的主要原因之一^[18]。半滑舌鳎伪雄鱼生长速度明显快于雄鱼，可能是伪雄鱼尽管发生性逆转，但生长相关基因的表达与正常雄鱼并不完全相同。

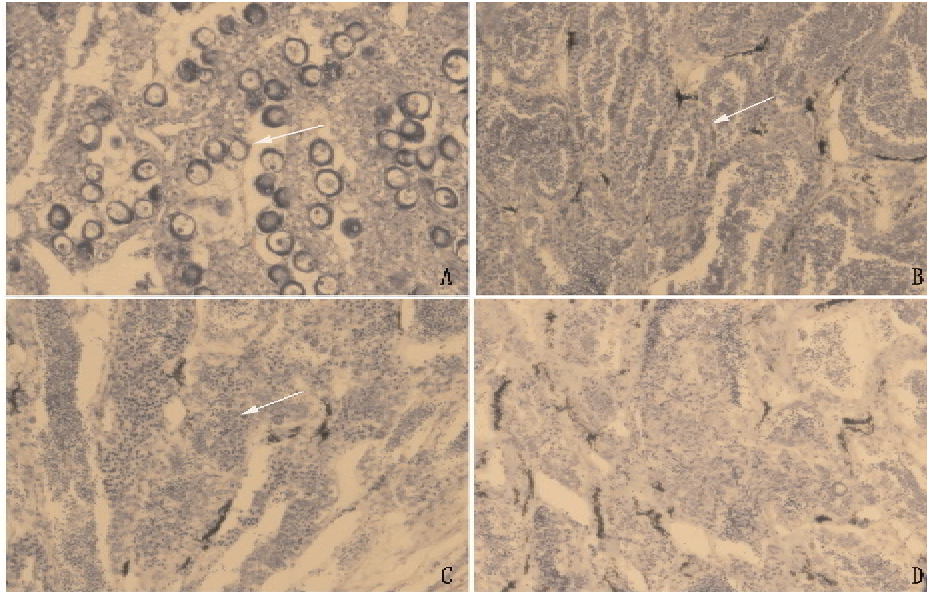


图2 半滑舌鳎自然性逆转伪雄鱼性腺组织学观察

A: 雌鱼(箭头示卵母细胞), B: 雄鱼(箭头示精母细胞), C: 自然性逆转伪雄鱼 1(箭头示精母细胞), D: 自然性逆转伪雄鱼 2。

Fig.2 Histological observation of gonads of natural sex-reversed tongue sole male

A: female(↑ show oocyte), B: male(↑ show spermatocyte), C: natural sex-reversed male 1(↑ show spermatocyte), D: natural sex-reversed male 2.

本文首先在 1 个亲鱼培育池中发现 1 尾自然性逆转的伪雄鱼,对养殖群体生理雄鱼大量检测,结果显示半滑舌鳎自然性逆转率为 1.66%。雌雄异体鱼类自然性逆转现象较少见,仅在青鳉^[12]、文昌鱼^[13]等少数几种鱼类上有报道,在半滑舌鳎这样的重要经济鱼类上更是鲜有报道。雌雄异体鱼类自然性逆转多是基因突变的结果,如青鳉雄性个体自然性逆转为雌性是 DMY 蛋白编码区发生变异或 DMY 表达量降低所致^[12]。在哺乳动物中也有相似报道,如老鼠 XY 个体性逆转是 FGF 基因缺失的结果^[19];狗 XX 个体性逆转是 SRY 基因突变的结果^[20];人 XX 个体性逆转,85% 是由于 SRY 基因移位到 X 染色体上或常染色体上导致的^[21]。人工诱导性逆转则是遗传基因和外部环境因子相互作用的结果,据报道,温度、pH 值、盐度、光照、水质、食物丰度和种群内部因素等都可能影响鱼类性别及其分化^[9]。邓思平等^[22-23]研究发现,28℃和 32℃高温能显著提高半滑舌鳎群体中的雄性比例,且诱导的性逆转伪雄鱼 DMRT1 的表达量与正常雄鱼的没有差异,并显著高于雌鱼,说明温度诱导半滑舌鳎性逆转后,改变了某些性别相关基因的表达量。邹记兴等^[24]研究发现,外源雄激素诱导点带石斑鱼性

逆转是通过抑制“雌性相关基因”的表达启动了其性逆转过程,诱发卵巢退化和精巢的发育,直至精子生成。本实验检测的半滑舌鳎生理雄鱼在 3 月龄前培育水温未超过 23℃,不存在高温诱导其性逆转的可能性。因此,半滑舌鳎自然性逆转是基因突变的结果,还是外部环境因子和遗传基因共同作用的结果,还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 姜言伟,万瑞景.渤海半滑舌鳎早期形态特征及发育特征的研究[J].海洋水产研究,1988,9:193-201.
- [2] Chen S L, Tian Y S, Yang J F, et al. Artificial gynogenesis and sex determination in the half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. Mar Biotech, 2009, 11(2): 243-251.
- [3] 周丽青,杨爱国,柳学周,等.半滑舌鳎染色体核型分析[J].水产学报,2005,29(3):417-419.
- [4] Chen S L, Deng S P, Ma H Y, et al. Molecular marker-assisted sex control in *Cynoglossus semilaevis* [J]. Aquaculture, 2008, 283(1-4): 7-12.
- [5] 桂建芳.鱼类性别和生殖的遗传基础及其人工控制[M].北京:科学出版社,2007.
- [6] Rougeot C, Jacob B S, Kestemont P, et al. Sex control

- and sex determinism study in Euroasian perch, *Perca fluviatilis*, by use of hormonally sex-reversed male breeders[J]. *Aquaculture*, 2002, 211(1): 81 - 89.
- [7] Pandian T J, Sheala S G. Hormonal induction of sex reversal in fish[J]. *Aquaculture*, 1995, 138(1): 1 - 22.
- [8] 储张杰. 黄鳝性逆转研究进展[J]. *水利渔业*, 2006, 26(6): 19 - 23.
- [9] 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[J]. *水产学报*, 2006, 30(2): 145 - 150.
- [10] 刘绪生, 梁冰, 张树义. 黑鲷 DMRT1 基因 cDNA 的克隆、组织表达谱及在性别逆转前后性腺中的表达[J]. *动物学研究*, 2004, 25(2): 158 - 161.
- [11] Moore R. Natural sex inversion in the giant perch (*Lates calcarifer*) [J]. *Aust J Mar Freshwat Res*, 1979, 30(6): 803 - 813.
- [12] Otake H, Shinomiya A, Matsuda M, et al. Wild-derived XY sex-reversal mutants in the medaka, *Oryzias latipes*[J]. *Genetics*, 2006, 173(4): 2083 - 2090.
- [13] Zhang S, Li G, Zhu J, et al. Sex reversal of the female amphioxus *Branchiostoma belcheri tsingtauense* reared in the laboratory[J]. *J Mar Biol Assoc U K*, 2001, 81(1): 181 - 182.
- [14] Chu Y W, Han Y S, Wang C H, et al. The sex-ratio reversal of the Japanese eel *Anguilla japonica* in the kaoping river of Taiwan; the effect of cultured eels and its implication[J]. *Aquaculture*, 2006, 261(4): 1230 - 1238.
- [15] 童金苟, 朱嘉濠, 关海山. 鱼类性别决定的遗传基础研究概况[J]. *水产学报*, 2003, 27(2): 169 - 176.
- [16] Chen S L, Li J, Deng S P, et al. Isolation of female-specific AFLP markers and molecular identification of genetic sex in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. *Mar Biotech*, 2007, 9(2): 273 - 280.
- [17] Ji X S, Zhao Y, Chen S L, et al. Successful fertilization of *Varicorhinus macrolepis* eggs with sperm subjected to two freeze-thaw cycles [J]. *Theriogenology*, 2008, 69(7): 793 - 797.
- [18] 马细兰, 张勇, 黄卫人, 等. 尼罗罗非鱼生长激素及其受体的 cDNA 克隆与 mRNA 表达的雌雄差异[J]. *动物学报*, 2006, 52(5): 924 - 933.
- [19] Bagheri-Fam S, Sim H, Bernard P, et al. Loss of Fgfr2 leads to partial XY sex reversal [J]. *Dev Biol*, 2008, 314(1): 71 - 83.
- [20] Kuiper H, Bunck C, Günzel-Apel A R, et al. SRY-negative XX sex reversal in a Jack Russell Terrier: a case report[J]. *Vet J*, 2005, 169(1): 116 - 117.
- [21] Camerino G, Parma P, Radi O, et al. Sex determination and sex reversal [J]. *Curr Opin Genetics Dev*, 2006, 16(3): 289 - 292.
- [22] 邓思平, 陈松林, 田永胜, 等. 半滑舌鳎的性腺分化和温度对性别决定的影响[J]. *中国水产科学*, 2007, 14(5): 714 - 719.
- [23] 邓思平, 陈松林. 半滑舌鳎 Dmrt1a 基因的 cDNA 克隆及其表达[J]. *中国水产科学*, 2008, 15(4): 577 - 584.
- [24] 邹记兴, 陶友宝, 向文洲, 等. 人工诱导点带石斑鱼性逆转的组织学证据及其机制探讨[J]. *高技术通讯*, 2003, 13(6): 81 - 86.

Natural sex reversal of female *Cynoglossus semilaevis* in rearing populations

JI Xiang-shan^{1,2}, CHEN Song-lin^{1*}, MA Hong-yu¹, JIANG Yun-liang²,
YANG Jing-feng¹, DONG Xiao-li¹

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

Abstract: Half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) is an important cultured marine fish and shows large sexual dimorphism in growth. In general, the females grow about four to five times faster than males. However, the percentage of males in cultured group is higher than that of females. Is the sex ratio deviation from expected value (1:1) associated with natural sex reversal? In the present study, the natural sex reversal phenomenon in half-smooth tongue sole was studied by means of female specific marker sex identification technique. We determined the phenotypic sex of 71 four-year-old half-smooth tongue sole by means of abdominal compression during reproduction season. The individuals not producing sperm or eggs were injected with (0.4–2.0) $\mu\text{g}/\text{kg}$ LRHA₃ and fed in concrete tanks until sexual maturation. In total, there were 39 phenotypic males and 32 females, and the mean body weight of phenotypic males was (0.339 ± 0.078) kg and (1.471 ± 0.214) kg of females. However, the body weight of one phenotypic male was 0.585 kg and significantly higher than other males. The female-specific marker analysis also showed that the phenotypic male tongue sole produced female-specific band, but not other 38 phenotypic males; 32 phenotypic females all produced female-specific fragment of about 205 bp. As a result, the phenotypic male half-smooth tongue sole producing female-specific fragment could be natural sex reversal male (neomale). Large-scale genetically sexual identification of phenotypic males in Laizhou Mingbo Co. Ltd showed the rate of natural sex reversal was 1.66%. It also proved that phenomenon of natural sex reversal in tongue sole was universal. Histological analysis of the sex-reversal male gonads showed that they contained functional testicular tissue with spermatocytes. However, the amounts of spermatocytes in sex reversal individuals were fewer than that in control males. The phenomenon of natural sex reversal of female half-smooth tongue sole is helpful to explain the high male percentage in cultivating group and provides a new technique to produce all-female half-smooth tongue soles.

Key words: *Cynoglossus semilaevis*; natural sex reversal; female specific marker; neomale

Corresponding author: CHEN Song-lin. E-mail: chensl@ysfri.ac.cn