

半滑舌鳎养殖群体的性比与雌雄形态差异比较

李虎^{1,2}, 陈四清³, 刘海金^{2*}, 姜宏波⁴, 王美玉⁵

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

2. 中国水产科学研究院, 北京 100141;

3. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

4. 沈阳农业大学畜牧兽医学院, 辽宁 沈阳 110866;

5. 东北农业大学动物科学技术学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 为研究半滑舌鳎养殖群体幼鱼阶段的性比变化, 实验用分子标记法鉴定半滑舌鳎遗传性别, 用组织切片方法鉴定表型性别, 并比较了表型雌雄的生长差异。结果发现, 在半滑舌鳎幼鱼阶段, 在遗传性别上, 雌雄所占比例约为 1:1, 差异不显著 ($P > 0.05$)。在表型性别上, 雌雄比例约为 1:3, 差异极显著 ($P < 0.01$)。表型雄性中, 由遗传性雄性和遗传上为雌性而表型上为雄性的“伪雄鱼”两部分组成。在养殖群体中, 表型雌性、伪雄鱼和雄性三者的比例大致为 1:1:2。养殖现场反映的雌性约占 1/4 的情况与本研究结果基本一致。本研究没有发现遗传上为雄性, 而表型上为雌性的个体。在 6~8 月龄间, 伪雄鱼的全长、体质量处于表型雌性与正常雄性之间, 与两者均无显著差异。在相似全长范围内, 雄鱼体高小于雌鱼, 雄鱼的全长/体高的平均值为 4.05, 雌鱼的平均值为 3.89, 雄鱼的全长/体高比值显著大于雌鱼 ($P < 0.05$), 此比值可以作为区分雌雄鱼苗种的参考。

关键词: 半滑舌鳎; 性比; 形态差异; 伪雄鱼

中图分类号: Q 343.2; S 965

文献标志码: A

半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*) 属鲽形目 (Pleuronectiformes)、舌鳎科 (Cynoglossidae)、舌鳎属 (*Cynoglossus*), 俗称龙利、牛舌头、鳎米等, 主要分布于我国黄渤海近海区, 具有活动范围小、个体大、生长速度快以及肉味鲜美等特点^[1], 是我国重要的经济鱼类。半滑舌鳎无论在规格上还是在生长速度上, 雌性都远大于雄性, 半滑舌鳎雄性个体经过两年培育尚不能达到商品规格^[2], 养殖者一般在苗种期淘汰雄性个体, 而仅保留雌性个体, 养殖至商品规格。因此, 雄性个体淘汰之前的养殖过程形成了巨大的浪费, 使效益下降。另外, 在苗种培育过程中, 又出现雄性个体比例远超过雌性的现象, 使养殖成本增加, 从而严重影响养殖者的经济效益。目前, 半滑舌鳎的雌性比例过小和如何尽早淘汰雄性个体已经成为半滑舌鳎养

殖业亟待解决的问题。

关于半滑舌鳎性别的研究, 周丽青等^[3]进行了半滑舌鳎染色体核型分析, 认为稚鱼期半滑舌鳎雌雄性比约为 1:1, 而这一时期半滑舌鳎的性腺尚未分化, 因此此时的雌雄指的是遗传性别^[4]。随着水温和养殖条件不同, 半滑舌鳎雄性比例有所不同, 但均较大, 最高达到 2/3 以上, 雄性中有性逆转个体^[5]。关于提高半滑舌鳎雌性比例的问题, 不少研究者进行了尝试。邓思平等^[5]研究发现, 温度不能诱导半滑舌鳎雄性向雌性转化, 即温度调控不能使雌性率超过 50%。张晓彦等^[2]利用激素 17 β -雌二醇诱导出 97% 的雌鱼, 基本接近全雌, 但是此种方法隐藏着食品安全和影响环境的弊端, 不适合生产性应用。在半滑舌鳎苗种生产现场, 雌性一般占 1/3~1/4, 但无

收稿日期:2012-02-10 修回日期:2012-05-29

资助项目:国家鲜鲽类产业技术体系建设项目(GARS-50-G2)

通讯作者:刘海金, E-mail:liuhaijin2005@126.com

严谨的调查报告。为了掌握养殖现场的准确情况,本研究调查了半滑舌鳎早期遗传与表型性别比例,以及雌雄个体的形态和生长差异,旨在为解决半滑舌鳎的雌雄性比难题提供基础数据和参考资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

山东某养殖场 20 ℃ 水温培育的半滑舌鳎幼鱼,自 6 月龄起至 8 月龄,每月采样一次,每次随机采样 52 尾,合计 156 尾。分别测量体长、体高、体质量;采取尾鳍组织用于测定遗传型性别;用 Bouin 氏液固定性腺,用于测定表型性别。

用 3 组雌雄半滑舌鳎为亲本分别进行人工受精,孵出 2 日后,每组分别随机采样 30 尾,用性别连锁标记,分析遗传性雌雄比例。

采集 8 月龄幼鱼 30 尾尾鳍组织,分别进行染色体制备,分析染色体核型。

1.2 遗传性别鉴定

分子标记法 DNA 提取方法与刘海金等^[6]相同,略有改动。利用 Chen 等^[7]开发的与性别连锁的 CseF-SSR1 标记鉴定半滑舌鳎遗传性别,在聚丙烯酰胺凝胶中呈现双带者鉴定为遗传雌性,单带者鉴定为遗传雄性。

染色体核型分析法 染色体制备方法与周丽青等^[3]的幼鱼制备方法相同。具异型染色体者为遗传雌性,不具异型染色体者为遗传雄性。两种方法结合,以分子标记法为主,染色体核型分

析法辅助验证。

1.3 表型性别鉴定

性腺固定 12 ~ 24 h 后,分级乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,用切片连续切片,厚度为 5 μm,经 H. E 染色,中性树胶封片,37 ℃ 烘干后,Leica 显微镜镜检以鉴定生理性别,即表型性别。遗传上为雌性而经生理学鉴定具卵巢者为表型雌鱼,遗传上为雌性而经生理学鉴定具精巢者为伪雄鱼,遗传上为雄性而具精巢者为正常雄鱼。遗传学上为雄性,从未发现具卵巢的。

1.4 数据处理

两种雌雄比例差异,雌雄生长差异采用 Excel 2007 进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 遗传/表型雌雄性比及伪雄鱼比例

根据染色体核型分析方法,具有大型染色体的个体为遗传雌性,不具有大型染色体的个体为遗传雄性,雌性具有一个大型的染色体,而雄性只有小型染色体(图 1);用 CseF-SSR1 标记鉴别半滑舌鳎的性别(图 2),通过 30 尾样本的对比分析,利用染色体与利用分子标记两种方法鉴别性别的结果是一致的(表 1)。结果表明,可以依分子标记法鉴定的遗传性别。6 ~ 8 月龄半滑舌鳎的性腺组织,经切片观察,可以清晰地区分雌雄(图 3);以此结果作为生理学性别,即表型性别。

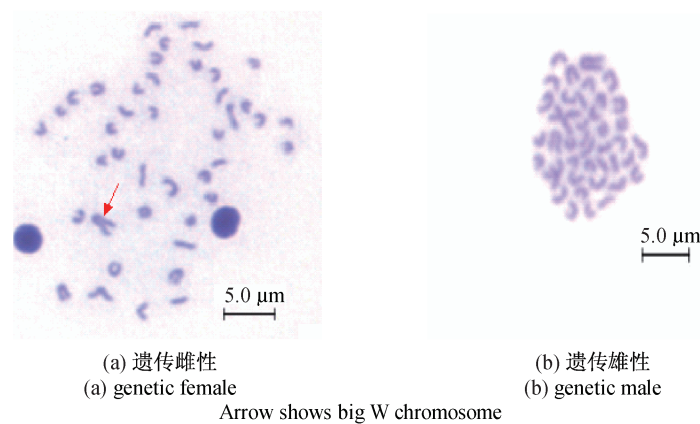


图 1 半滑舌鳎雌雄染色体核型

Fig. 1 The analysis of karyotype of half-smooth tongue sole

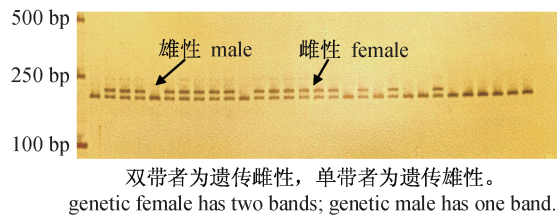
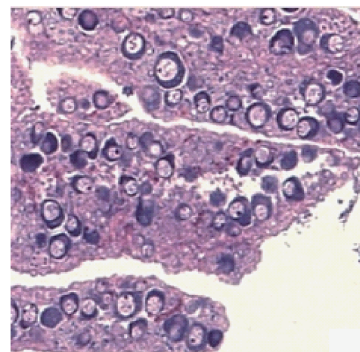
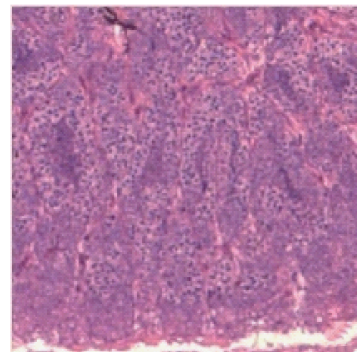


图 2 CseF-SSR1 鉴定半滑舌鲷遗传性别
Fig. 2 Genetic sex identification of half-smooth tongue sole by using CseF-SSR1 marker



(a) 卵巢
(a) ovary



(b) 精巢
(b) testis

图 3 H. E 染色区分半滑舌鲷表型性别

Fig. 3 Distinguishing of phenotypic sex of half-smooth tongue sole by using H. E staining

在遗传性别上,雌雄比例分别为 45.5% 和 54.5%,近似 1:1(表 1),不具显著差异($P > 0.05$);在表型性别上,表型雄性所占的比例是 75.2%,表型雌性为 24.8%,差异达到极显著水

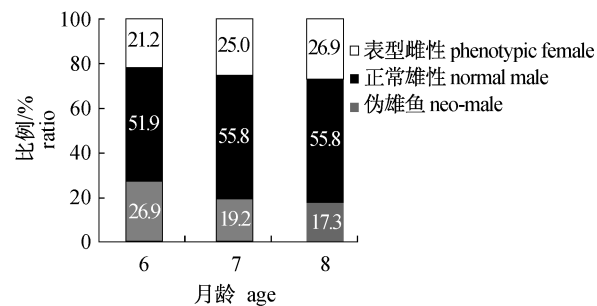


图 4 表型雌性、正常雄性以及伪雄鱼的比例

Fig. 4 The ratios of phenotypic female, normal male and neo-male

表 1 半滑舌鲷遗传雌雄、表型雌雄及伪雄鱼比例
Tab. 1 The genetic and phenotypic sex ratio of half-smooth tongue sole and the neo-male ratio

	G - F	G - M	♀	♂	neo - M
样本 sample	71	85	38	118	33
比例/% ratio	45.51 ^a	54.49 ^a	24.82 ^b	75.18 ^c	21.15 ^b

注:相同字母代表差异不显著($P > 0.05$),不同字母代表差异显著($P < 0.05$)。G - F. 遗传雌性,G - M. 遗传雄性,♀. 表型雌性,♂. 表型雄性,neo - M. 伪雄鱼,N. 标本数量。

Notes: same letters mean no significant difference ($P > 0.05$), different letters mean significant difference ($P < 0.05$). G - F. genetic female, G - M. genetic male, ♀. phenotypic female, ♂. phenotypic male, neo - M. neo - male, N. number.

平($P < 0.01$)。遗传性别为雌性的个体中,有 53.5% 具有卵巢,且卵巢发育正常,表型为雌性;有 46.5% 的个体具有精巢,表型为雄性的伪雄鱼;表型雌性与伪雄鱼数量差异不显著($P > 0.05$)。遗传雌性分化成表型雌性和伪雄鱼两部分,而表型雄性由伪雄鱼和正常雄鱼构成,后两者之和为表型雄性所占的比例(图 4)。遗传性别为雄性的个体全部发育成精巢,表型为雄性。没有发现遗传上为雄性,而表型上为雌性的个体。

2.2 仔鱼期雌雄比例

用 CseF-SSR 标记分析半滑舌鲷 2 日龄仔鱼 88 尾,结果是,遗传雌性 45 尾,遗传雄性 43 尾,即半滑舌鲷在仔鱼期雌雄比例接近 1:1(图 5),表明在仔鱼阶段雌雄比例无显著性差异。

2.3 表型雌雄及伪雄鱼生长情况

表型雌雄平均全长、体质量及其差异性比较

见表 2。在体质量上,半滑舌鲷表型雌雄之间在 6 月龄时已具显著性差异 ($P < 0.05$),6 月龄以后,两者之间的差距持续增大;在全长方面,表型雌雄之间在 6 月龄时已有较大差异,而在 8 月龄时达显著性水平。6~8 月龄间,表型雌性无论在全长还是在体质量上,都显著大于正常雄性 ($P < 0.05$) (图 6);而伪雄鱼在全长、体质量两个方面均处于表型雌性和正常雄性之间,比表型雌性稍小,比正常雄性稍大,但均未达显著性水平。从 7 月龄起,伪雄鱼的全长、体质量值逐渐趋近于正常雄鱼,而与表型雌性拉大差距。

表 2 半滑舌鲷表型雌雄全长、体质量差异性比较

Tab. 2 Analysis of half-smooth tongue sole BL and BW among phenotypic male and female at different months

	6 months		7 months		8 months	
	全长/mm total length	体质量/g body weight	全长/mm total length	体质量/g body weight	全长/mm total length	体质量/g body weight
♀	107.28 ± 10.84 ^a	6.93 ± 1.84 ^a	114.12 ± 17.38 ^a	9.84 ± 4.20 ^a	123.03 ± 16.70 ^a	10.86 ± 3.39 ^a
♂	100.76 ± 11.76 ^a	5.67 ± 1.72 ^b	108.49 ± 18.33 ^a	7.55 ± 3.31 ^b	110.74 ± 17.93 ^b	8.60 ± 3.50 ^b
总和 sum	102.14 ± 11.78 ^a	5.94 ± 1.80 ^{ab}	109.90 ± 18.10 ^a	8.12 ± 3.65 ^{ab}	114.05 ± 18.29 ^{ab}	9.21 ± 3.58 ^{ab}

注: 同列相同字母代表差异不显著 ($P > 0.05$), 不同字母代表差异显著 ($P < 0.05$)。

Notes: Between two values in the same column, same letters mean no significant difference ($P > 0.05$), different letters mean significant difference ($P < 0.05$).

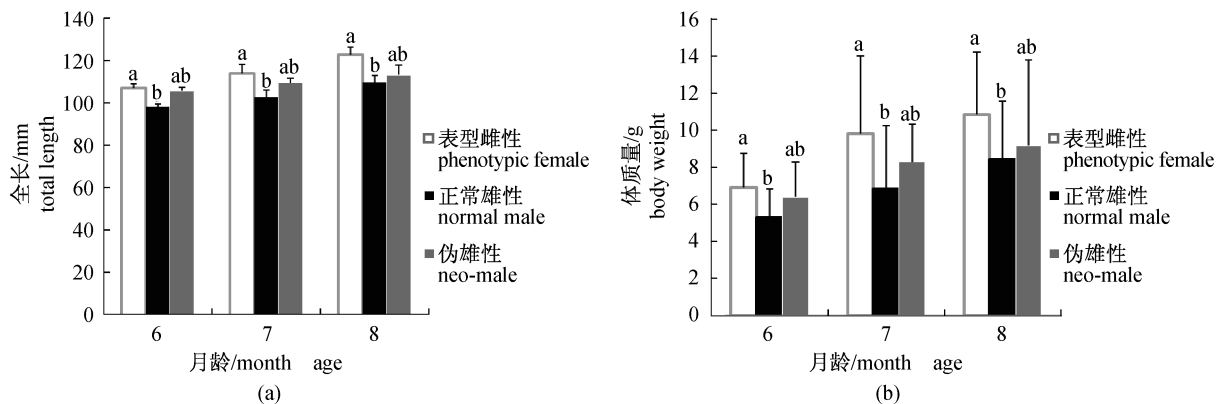


图 6 半滑舌鲷表型雌性、正常雄性与伪雄鱼的全长和体质量

Fig. 6 The total length and body weight of phenotypic female, normal male and neo-male

2.4 半滑舌鲷雌雄形态差异

观察发现,半滑舌鲷雄性较雌性窄长,即相近全长范围内,雄性的体高小于雌性。数据分析显示,6~8 月龄间,半滑舌鲷雄性平均全长/体高 (TL/BH) 为 4.05,显著大于雌性的 3.89 ($P < 0.05$)。在全长大于 110 mm 个体中,85.4% 的表型雄性的 TL/BH 值大于 4.0,84.2% 的表型雌性的全长/体高值小于 4.0;当全长小于 110 mm 时,表型雌雄的全长/体高值差异不明显,不过表型雄

性已具备向窄长方向生长的趋势。

根据全长与表型性别的相关关系,可以看出,在全长小于 105 mm 的较小个体区间内,表型雄性占到 87%,76.3% 的表型雌性处于全长大于 105 mm 的较大个体区间内。

3 讨论

鱼类作为一类较低等的生物,其性别不如哺乳动物那样的稳固,具有较大的可塑性^[8]。通过温度

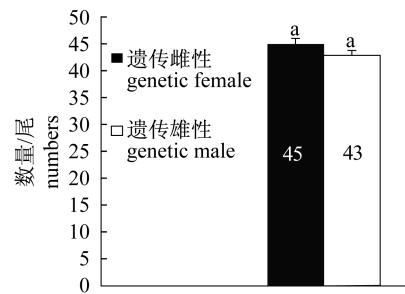


图 5 半滑舌鲷初孵仔鱼遗传雌雄比例

Fig. 5 The rates of genetic female and male in half smooth tongue sole fry

控制或外源激素刺激,已经在半滑舌鲷^[2]、河鲈(*Perca fluviatilis*)^[9]、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)^[10]、黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)^[11]等几十种鱼类中实现了性别逆转。相较于人工诱导性逆转,鱼类的自然性逆转现象并不多见,且多发现于雌雄同体鱼类中^[12-15]。季相山等^[16]利用雌性特异标记检测人工养殖的 600 尾表型雄性半滑舌鲷,发现其中伪雄鱼比例为 1.66%,而本研究检测出的为 21.2%,相差较大,推测两者巨大差异的原因是季相山等^[16]所检测的样本为性成熟个体,不能确定在样本群生长早期是否进行了筛选淘汰,而本研究所检测的样本是未经淘汰的群体。检测发现,半滑舌鲷初孵仔鱼的遗传雌雄性别比例接近 1:1,与周丽青等^[3]的结果基本一致。6~8 月龄时,半滑舌鲷在遗传性别上,雌雄比例约为 1:1,两者无显著差异;表型雌性占 24.8%,接近张晓彦等^[2]检测的 26%,与伪雄鱼所占 21.2%的比例无显著差异,推测半滑舌鲷经人工受精产生遗传雌雄各半的个体,在性腺发育分化的过程中,遗传雌性的一部分正常发育成卵巢,表现为雌性;另一部分发生性逆转,发育成精巢,即伪雄鱼;两者在数量上无显著差异。而遗传雄性则正常发育成雄鱼,故表型雌性、伪雄鱼和正常雄性三者的比例大致为 1:1:2。综合统计,表型雌雄比例则为 1:3。从此结果可以看出,在自然状态下,遗传雌性可能转化为表型雄性,而遗传雄性不能转化为表型雌性,是不可逆的,这一结果与牙鲆的特征相一致^[17]。对于遗传雌性个体转化为雄性,以及其诱导因子及环境条件则有待于进一步研究。

6 月龄以后,伪雄鱼在全长体质量两个方面均处于表型雌性和正常雄性之间,比表型雌性稍小,比正常雄性稍大,但均未达显著性水平($P > 0.05$)。但是从 7 月龄起,伪雄鱼的体质量和全长与表型雌性的差距拉大,而逐渐趋近正常雄性。同时,这一阶段正是半滑舌鲷性腺分化完成的时期。半滑舌鲷卵巢大约从 2 月龄时开始分化,到 4 月龄时形成明显的卵巢腔;精巢的发育晚于卵巢,在 5 月龄时出现精小叶,标志着精巢初始形成,到 7 月龄时分化完成^[2,18]。这预示着,伪雄鱼在性腺发育初期,主要受遗传性别控制,其生长与表型雌性相近;但是随着其性腺的发育和分化完成,表型性别的影响增大,其生长逐步趋向有共同

表型的正常雄性,而与表型雌性拉开差距。由此可以推测,半滑舌鲷雌雄之间的生长差异性受遗传性别影响较小,而与表型性别(即精巢或卵巢)密切相关。至于表型(生理)性别影响半滑舌鲷生长的机制还有待深入探讨。

参考文献:

- [1] 邓景耀,孟田湘,任胜民,等. 渤海鱼类种类组成及数量分布[J]. 海洋水产研究,1988(9):10-98.
- [2] 张晓彦,刘海金. 17β -雌二醇对半滑舌鲷性分化和生长的影响[J]. 东北农业大学学报,2009,40(6):67-72.
- [3] 周丽青,杨爱国,柳学周,等. 半滑舌鲷染色体核型分析[J]. 水产学报,2005,29(3):417-419.
- [4] 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]. Marine Biotechnology, 2007, 9(2): 273-280.
- [5] 邓思平,陈松林,田永胜,等. 半滑舌鲷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.
- [6] 刘海金,刘永新,王玉芬,等. 牙鲆减数分裂与有丝分裂雌核发育的遗传差异[J]. 水产学报,2010,34(6):888-904.
- [7] Chen S L, Ji X S, Shao C W, et al. Induction of mitogynogenetic diploids and identification of WW super-female using sex-specific SSR markers in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. Marine Biotechnology, 2012, 14(1):120-128.
- [8] 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.
- [9] Rougeot C, Jacob B S, Kestemont P, et al. Sex control and sex determinism study in European perch, *Perca fluviatilis*, by use of hormonally sex-reversed male breeders [J]. Aquaculture, 2002, 211(1):81-89.
- [10] Yamamoto E. Application of gynogenesis and triploidy in hirame (*Paralichthys olivaceus*) breeding [J]. Fish Genet Breeding Sci, 1992, 18:3-23.
- [11] 姚道霞. 黄颡鱼性分化及激素诱导性转化研究[D]. 哈尔滨:东北林业大学,2007:1-56.
- [12] 储张杰. 黄鲈性逆转研究进展[J]. 水利渔业, 2006,26(6):19-23.
- [13] 李广丽,刘晓春,林浩然. 17α -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.

- [14] 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.
- [15] Moore R. Natural sex inversion in the giant perch (*Lates calcarifer*) [J]. Australian Journal of Marine & Freshwater Research,1979,30(6):803-813.
- [16] 季相山,陈松林,马洪雨,等. 半滑舌鲷养殖群体中自然性逆转伪雄鱼的发现[J]. 水产学报,2010,34(2):322-327.
- [17] 山本栄一. ヒラメの人為的性制御とクローン集団作出に関する研究[J]. 鳥取県水産試験場報告,1995,34(1):1-145.
- [18] 马学坤,柳学周,温海深,等. 半滑舌鲷性腺分化的组织学观察[J]. 海洋水产研究,2006,27(2):55-61.

Study on sex ratio and comparison of morphological variation between genders of cultured half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)

LI Hu^{1,2}, CHEN Si-qing³, LIU Hai-jin^{2*}, JIANG Hong-bo⁴, WANG Mei-yu⁵

(1. College of Aquaculture and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100141, China;

3. Yellow Sea Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

4. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China;

5. College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: Studies were conducted to reveal the changes in sex ratio of juvenile half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) in cultured group by identified genetic sex and phenotypic sex with SSR marker and histological section, respectively. Meanwhile, further comparative analysis of growth and morphological characteristics among female, male, and sex reversal male (neo-male) were carried out. The results were as follows. Genetically, there was no significant difference between females and males with the sex ratio 45.5% to 54.5%; however, only 53.5% of genetic females had ovaries, while 46.5% of them had testes. The genetic males all had testes, no sex reversal happened. As a whole, the ratio of males was 75.2% and significantly higher than the ratio of females 24.8% morphologically ($P < 0.05$). The growth of neo-male half-smooth tongue sole was higher than the normal males, while lower than the phenotypic females between 6 months post hatching (mph) to 8 mph, but no significant difference was found ($P > 0.05$). Interestingly, the body height of the phenotypic females was higher than the phenotypic males when they had the same total length. In general, the average ratio of total length to body height of phenotypic males was 4.05, however, the phenotypic females was 3.89. This ratio would be useful for discrimination of the gender of juvenile half-smooth tongue sole.

Key words: *Cynoglossus semilaevis*; sex ratio; morphological variation; neo-male

Corresponding author: LIU Hai-jin. E-mail: liuhaijin2005@126.com