

半滑舌鳎快速生长及高雌性家系的筛选

陈松林^{1*}, 李仰真^{1,2}, 张 静^{1,2}, 刘寿堂³, 孙德强³, 杜 民¹,
梁 卓¹, 刘 峰^{1,2}, 胡乔木^{1,2}, 邵长伟¹, 刘珊珊¹

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所,农业部海洋渔业可持续发展重点实验室,山东 青岛 266071;

2. 上海海洋大学水产与生命学院,上海 201306;

3. 海阳市黄海水产有限公司,山东 海阳 265122)

摘要:为查明半滑舌鳎不同家系雌、雄鱼遗传和生理性别比例及其与生长速率的关系,并试图筛选出生理雌鱼比例高且生长快的家系,实验首先建立了 22 个半滑舌鳎家系,并进行同池养殖以比较生长性能,再选取 5 个正常雄鱼家系和 5 个伪雄鱼家系进行遗传性别和生理性别测定。结果发现,不同家系鱼苗不仅生长速度差异显著,而且雌雄比例差异也很显著。筛选出生长快速的家系 2 个(家系 16 号和 61 号),其相对增重率分别为 0.81 和 0.56 g/d;筛选出生长较快的家系 4 个(家系 21、28、57 和 63 号),其相对增重率为 0.48~0.53 g/d;筛选出生长速度一般的家系 12 个,生长慢速家系 4 个。所检测的 5 个正常雄鱼(ZZ 类型)家系的遗传雌鱼比例平均为 51.87%,生理雌鱼比例平均为 42.94%,遗传雌鱼转化为生理雄鱼的比例平均为 14.08%。相反,检测的 5 个伪雄鱼(ZW 类型)家系的遗传雌鱼比例平均为 49.34%,生理雌鱼比例平均为 4.45%,遗传雌鱼转化为生理雄鱼的比例平均为 91.41%。实验发现半滑舌鳎不同家系在雌、雄生理性别比例上存在明显差异;伪雄鱼后代中的遗传雌鱼更容易转化为伪雄鱼,增加养殖群体中生理雄鱼的数量。研究表明,通过家系选育可以筛选出雌性比例高、生长速度快的半滑舌鳎家系。

关键词:半滑舌鳎;家系;生长性状;性别;选育

中图分类号:S 965.3

文献标志码:A

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)是我国特有的一种名贵经济海水鱼类,属于近海温水性底层鱼类,我国沿海均有分布,以黄海、渤海为多。半滑舌鳎味道鲜美、肉质细嫩、营养丰富,深受广大消费者欢迎,其市场价值极高,养殖前景非常广阔,已成为我国海水主要养殖鱼类之一。

近几年的养殖实践和研究表明,半滑舌鳎雌性个体和雄性个体在生长速率上存在很大差别,在 21 月龄时,半滑舌鳎雌性个体平均体质量为 621 g,而雄性个体平均体质量只有 189 g^[1]。同时,养殖实践还表明,半滑舌鳎人工养殖群体中能长成大鱼(500 g 以上)的生理雌鱼比例一般只有

10%~30%,而雄鱼比例则高达 70%~90%。由于雄性个体生长缓慢而比例高,影响了商品鱼的质量,降低了半滑舌鳎的养殖产量,增加了养殖成本,影响了半滑舌鳎苗种的推广,限制了半滑舌鳎养殖产业的发展。因此,开展半滑舌鳎养殖群体性别比例分析,探索降低养殖群体中雄鱼比例、提高雌鱼比例的技术途径,培育半滑舌鳎高雌性苗种或品种,对于半滑舌鳎苗种的推广及其养殖业的发展具有重要意义。鉴于性别鉴定和控制半滑舌鳎养殖业中的重要意义和应用价值,近几年国内开展了大量研究工作,如 Chen 等^[2]发现了半滑舌鳎雌性特异 AFLP 分子标记,建立了半滑

收稿日期:2012-09-10 修回日期:2013-01-07

资助项目:公益性行业(农业)科研专项(200903046);国家“八六三”高技术研究发展计划(2012AA10A403-2);山东省泰山学者建设工程专项

通信作者:陈松林,E-mail:chensl@ysfri.ac.cn

舌鳎 ZZ 雄鱼和 ZW 雌鱼遗传性别鉴定技术;最近,Chen 等^[3]又筛选到半滑舌鳎性别连锁微卫星标记,建立了区分 ZW 雌鱼和 WW 超雌鱼的分子方法;同时季相山等^[4]首次发现在半滑舌鳎养殖群体中存在一定数量的伪雄鱼(即遗传性别为雌性、生理性别为雄性)。随后,Chen 等^[3,5]相继建立了半滑舌鳎减数雌核发育和卵裂雌核发育诱导技术,并在卵裂雌核发育胚胎中筛选到 WW 超雌个体。这些研究为开展半滑舌鳎养殖群体中雌、雄鱼比例的分析提供了有效的技术手段。

家系选育作为传统选择育种技术,在海水鱼类快速生长和抗病优良品种选育中得到有效应用^[6-8]。由于家系的遗传背景比较单一和清晰,利用微卫星等分子标记技术可以对家系的亲代及子代的基因型进行测定,若能够鉴定鱼类的遗传性别,结合生理性别鉴定技术便可查明不同家系鱼苗的遗传性别和生理性别比例、研究温度等环境因子对鱼类性别比例的影响。目前,国外在罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)开展了温度处理对不同家系鱼苗性别比例影响的研究,并初步筛选出高雌比例的罗非鱼家系^[9]。

目前,关于半滑舌鳎苗种性别比例的研究较少,李虎等^[10]采用遗传性别鉴定技术对半滑舌鳎养殖群体雌雄比例进行分析后发现,幼鱼阶段半滑舌鳎遗传性别雌雄性比例约为 1:1,在生理性别上,雌雄比例约为 1:3。另外,周丽青等^[11]对半滑舌鳎染色体核型分析后得到相同的结果,即幼鱼期的半滑舌鳎雌雄比例约为 1:1。尽管我们以前曾发现高水温可以导致养殖群体中的遗传雌鱼转化为生理雄鱼,形成部分伪雄鱼^[12],但是,有关导致养殖群体中雄鱼比例高、雌鱼比例低的原因则未见报道,有关半滑舌鳎不同家系之间雌、雄鱼遗传性别和生理性别比例及其与家系生长的关系也未见报道。

为进一步研究半滑舌鳎性别比例及其与生长的关系,选育快速生长和雌性比例高的半滑舌鳎品种,本实验室近几年相继建立了大量半滑舌鳎家系^[8],为采用家系选育方式查明半滑舌鳎不同家系之间雌雄性比例以及筛选高雌性家系奠定了基础。本实验采用半滑舌鳎性别特异微卫星标记对人工建立的半滑舌鳎家系进行了遗传性别鉴定和分析,同时对不同家系的生长性能和生理性别比例进行了分析,从中筛选出生长速度快、雌性

比例高的优良家系,为半滑舌鳎高雌、高产良种培育提供了新的技术手段。

1 材料与方 法

1.1 半滑舌鳎亲鱼来源及人工催产、授精

建立半滑舌鳎家系用的亲鱼系人工养殖,有部分雄鱼为从渤海湾收集的野生雄鱼。雌性亲鱼体质量一般为 1.5~2.5 kg,雄性亲鱼体质量一般为 0.15~0.5 kg。半滑舌鳎亲鱼培育按照常规方法进行,催产用激素为促黄体素释放激素 A3(注射用促排卵 3 号)(宁波第二激素厂),在催产后 32~48 h,检查亲鱼排卵情况。首先挤压雌鱼腹部收集成熟卵于干燥量杯中,然后挤压雄鱼腹部,采集成熟精子,将精子与卵摇动混合,加入适量海水激活精子并轻轻搅拌使精卵混匀完成授精过程,将受精卵倒入 2 L 量杯中,静置 7~8 min,收集上浮卵(受精卵)转入 3 m³ 孵化桶中进行。

1.2 半滑舌鳎家系建立和苗种培育

半滑舌鳎家系建立于 2010 年 7 月至 2010 年 9 月在山东省莱州市明波水产有限公司进行。按照陈松林等^[8]的方法构建半滑舌鳎家系,来自一个家系的大约 50 mL 受精卵放在一个 3 m³ 的孵化缸中进行孵化和育苗。20~25 d 鱼苗伏底后根据鱼苗成活情况对鱼苗密度进行适当调整,每缸鱼苗数量保持在 1 000~2 000 尾。

1.3 半滑舌鳎家系鱼苗荧光标记及生长性能测定

2011 年 5 月,当不同家系鱼苗生长到 9~17 cm 时,从每个家系中随机取 200 尾鱼苗,采用黄、橙、红 3 种荧光染料对不同家系鱼苗进行标记,荧光标记方法参照陈松林等^[8]的方法。标记后的鱼苗混养在 25 m³ 的水泥池中。上述标记混合的家系鱼苗按照常规方法进行养殖,每隔 5 个月进行一次全长和体质量测量,测量参数包括全长(从吻端到尾鳍末端)和体质量 2 个指标,计算各个家系鱼苗全长和体质量的平均数。利用增重率(养殖期间增加的重量/实际养殖时间)评价不同家系的生长性能。本研究将日增重率在 0.55 g 以上的家系确定为快速生长家系,增重率为 0.45~0.55 g 的家系确定为较快生长家系,增重率为 0.35~0.45 g 的家系确定为生长速度一般的家系,而日增重在 0.35 g 以下的家系确定为慢速生长家系。同时结合各个家系的存活率情况,选育

出生长快、养殖存活率高的家系作为优良家系。

1.4 半滑舌鲷遗传性别鉴定

半滑舌鲷鱼苗和鳍条 DNA 提取按照 Chen 等^[3]的方法进行。半滑舌鲷家系遗传性别鉴定采用本实验室发掘的性别连锁微卫星标记 CseF-SSR1 进行^[3],其引物为 SChen-1,其上游序列为 5' gagccgacaggatcgtagc3',下游序列为 5' tacgacgtactccgggtggttt3'。微卫星标记的 PCR 扩增条件按照 Chen 等^[3]的方法进行。按照常规聚丙烯酰胺凝胶电泳对 PCR 产物进行分析。采用上述 PCR 引物,ZW 雌性个体产生 206 和 218 bp 的 2 条 DNA 带,而 ZZ 雄鱼则只产生 1 条 206 bp 的 DNA 条带。

1.5 半滑舌鲷生理性别鉴定

半滑舌鲷鱼种和成鱼的生理性别鉴定采用手电筒强光照鱼体性腺部位的方法进行。用手抄网将鱼捞出,用强光灯从鱼体背面性腺位置照射,在腹面性腺位置观察性腺颜色和形状,如果性腺比较狭长,颜色呈淡黄色或透明状为雌鱼,若性腺短而小,且颜色呈黑色或深蓝色则为雄鱼。将生理雌鱼比例达到 50%、且生长速度快的家系确定为高雌性家系,将这些家系筛选出来继续进行培育。

1.6 性腺组织切片鉴定生理性别

半滑舌鲷鱼苗性腺组织切片按照邓思平等^[12]的方法进行。半滑舌鲷雌雄鱼性腺取出后用 Bouin 氏液固定,对固定的性腺组织进行石蜡切片,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,采用 H. E 染色,Olympus 光学显微镜下观察鉴别性腺的生理性别。

1.7 统计分析

相对增重率 (relative weight gain rate, RWGR, g/d) = $(W_2 - W_1) / (T_2 - T_1)$; 式中 T_1 和 T_2 分别为两次测量时鱼苗的实际生长天数, W_1 和 W_2 分别为两次测量时间 T_1 和 T_2 时分别对应的平均体质量。

考虑到家系建立在时间上有先后,为保证结果的准确性,故对体质量进行了校正。最后一次测量时间为 2012 年 3 月 15 日,而半滑舌鲷家系建立时间为 2010 年 7 月 1 日至 9 月 2 日,所有家系的实际生长天数为 590~654 d,实验统一校正为 20 月龄 (600 d)。校正后的体质量 $BW' = BW + RWGR \times (600 - T)$; 式中 BW 为鱼苗的实际

平均体质量,RWGR 为相对增重率, T 为鱼苗的实际生长天数。全长也用此方法进行校正。

运用 SPSS 13.0 软件统计 20 月龄时各个家系鱼苗全长和体质量的平均值和标准差,并进行单因素方差分析 (One-way ANOVA),利用最小显著极差法 (least significant difference, LSD) 对半滑舌鲷各个家系体质量进行多重比较。

2 结果

2.1 半滑舌鲷不同家系亲本的遗传性别分析

用于家系建立的半滑舌鲷雌性亲本 DNA 都可以扩增出 206 和 218 bp 两个等位基因,雄性亲本则有 2 种类型:如从雄性亲本 DNA 中只扩增出 206 bp 等位基因的个体为遗传上的雄性个体,即真正的雄鱼;而从基因组 DNA 中扩增出 206 和 218 bp 两个等位基因的生理雄性则为遗传上的雌性个体,即伪雄鱼 (图 1)。

2.2 半滑舌鲷不同家系鱼苗的生长性能比较

半滑舌鲷 16、21、28、57、61 和 63 号家系增重较快 (表 1)。最后一次测量显示,16 号和 61 号家系平均体质量分别达 259.96 和 171.98 g,明显高于对照及其他家系,为生长快速家系;21、28、57 和 63 号家系增重也较快,平均体质量分别为 164.27、168.76、152.83 和 148.12 g,明显高于对照家系,为生长较快家系。与之相反,4、20、43 和 56 号家系生长较慢,平均体质量均不足 120 g,明显低于其他家系和对照家系,为生长慢速家系。在这 4 个生长慢速家系里,其中有 3 个家系 (4、20 和 56 号) 为伪雄鱼家系。

半滑舌鲷 16 号和 61 号家系的相对增重率分别为 0.81 和 0.56 g/d,明显高于对照组 (0.39 g/d) (表 2),这 2 个家系的平均体质量极显著高于对照组 ($P < 0.01$) (表 3),因此,16 号和 61 号家系为快速生长家系;生长速度较快的家系有 4 个,其相对增重率为 0.48~0.53 g/d,包括 21、28、57 和 63 号家系,其体质量也显著高于对照组 ($P < 0.05$);生长速度一般的家系有 12 个,其相对增重率为 0.36~0.47 g/d;还有 4 个家系 (包括 4、20、43 和 56 号家系) 的相对增重率为 0.36 g/d 及以下,为生长慢速家系 (表 2)。在 4 个慢速生长家系中,4、20 和 56 号家系为伪雄鱼家系,再一次证明了伪雄鱼家系鱼苗生长较慢。实验发现,3 个家系 (4、16 和 17 号) 存活率较高,达到 65% 以上,

其中17号家系高达75.0%,均明显高于对照组不足20%,其中63号家系仅为14.0%,均明显低的38.0%。38、43、63和69号的存活率则很低,于对照组。

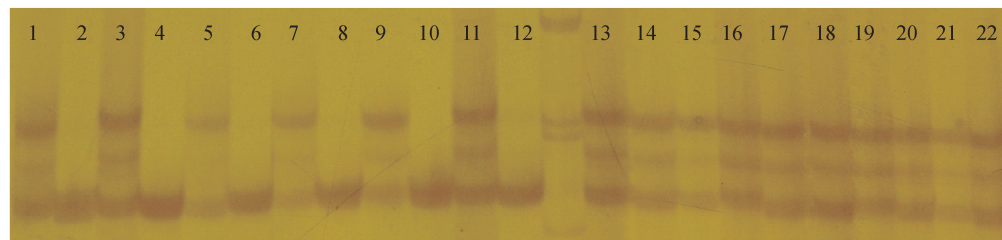


图1 半滑舌鲷不同家系亲本遗传性别鉴定

1~12为正常亲本电泳图,13~22为伪雄鱼亲本电泳图;其中1、3、5、7、9、11分别为正常雄鱼家系5、16、28、38、40和44号的雌性亲本;2、4、6、8、10、12分别为正常雄鱼家系5、16、28、38、40和44号的雄性亲本;13、15、17、19、21分别为伪雄鱼家系2、3、4、9和13号的雌性亲本;14、16、18、20、22分别为伪雄鱼家系2、3、4、9和13号的雄性亲本。

Fig. 1 The identification of genetic sex of different families of *C. semilaervis*

1-12. the electrophoretogram of normal families, number 13 to 22 are the electrophoretogram neo-male families; 1, 3, 5, 7, 9, 11. female parents of normal families of 5, 16, 28, 38, 44 respectively; 2, 4, 6, 8, 10, 12. male parent of normal families of 5, 16, 28, 38, 44 respectively; 13, 15, 17, 19, 21. female parents of neo-male families of 2, 3, 4, 9, 13; 14, 16, 18, 20, 22. male parents of neo-male families of 2, 3, 4, 9, 13.

表1 半滑舌鲷各个家系不同生长阶段的平均全长和平均体质量

Tab. 1 Average body length and weight of each family of *C. semilaervis*

家系号 family no.	第一次测量 the first time		第二次测量 the second time		第三次测量 the third time	
	全长/cm body length	体质量/g body weight	全长/cm body length	体质量/g body weight	全长/cm body length	体质量/g body weight
3	16.90 ± 2.07	26.93 ± 11.94	25.20 ± 2.51	104.23 ± 29.22	26.87 ± 3.82	129.88 ± 51.55
4	14.88 ± 1.56	17.07 ± 6.07	24.02 ± 1.56	81.53 ± 15.40	26.47 ± 2.30	114.75 ± 28.47
5	15.57 ± 2.04	21.57 ± 8.88	25.07 ± 3.46	109.37 ± 61.15	26.77 ± 5.36	141.73 ± 107.17
6	15.95 ± 2.23	24.15 ± 11.25	25.42 ± 2.80	109.17 ± 47.99	28.29 ± 4.29	152.49 ± 93.10
7	15.54 ± 1.74	23.17 ± 7.29	24.90 ± 1.67	97.33 ± 21.81	27.09 ± 3.73	132.98 ± 73.22
14	14.04 ± 2.53	17.06 ± 9.10	23.78 ± 3.09	87.44 ± 28.98	27.60 ± 3.92	150.58 ± 77.04
16	14.64 ± 2.02	19.02 ± 7.50	28.27 ± 3.06	159.41 ± 53.87	32.27 ± 6.68	259.96 ± 155.78
17	14.33 ± 1.56	18.07 ± 5.76	24.98 ± 2.37	108.70 ± 35.33	27.53 ± 4.28	146.16 ± 70.06
20	11.27 ± 1.87	10.73 ± 3.86	21.55 ± 2.60	64.72 ± 21.38	24.92 ± 2.66	95.29 ± 31.37
21	14.61 ± 1.69	18.30 ± 6.45	26.32 ± 2.26	120.37 ± 32.44	29.35 ± 3.63	164.27 ± 65.64
28	12.21 ± 2.51	11.76 ± 6.50	23.28 ± 3.03	86.44 ± 34.59	28.82 ± 5.38	168.76 ± 104.95
38	11.38 ± 1.94	9.52 ± 3.83	21.53 ± 3.62	65.96 ± 33.04	27.83 ± 5.17	140.78 ± 75.11
39	13.26 ± 1.99	13.12 ± 5.26	22.98 ± 4.21	87.47 ± 41.72	27.68 ± 5.53	146.16 ± 86.99
40	13.03 ± 1.83	14.63 ± 5.28	21.91 ± 4.15	86.43 ± 46.57	26.40 ± 5.77	148.86 ± 102.10
43	9.58 ± 1.27	4.56 ± 1.62	19.40 ± 2.55	51.13 ± 24.41	23.98 ± 3.03	88.87 ± 45.17
44	13.36 ± 2.19	13.98 ± 6.08	23.64 ± 3.63	92.35 ± 43.11	27.61 ± 5.10	146.80 ± 93.06
56	12.63 ± 1.96	11.66 ± 5.05	20.37 ± 2.63	54.46 ± 20.57	24.86 ± 2.80	95.69 ± 34.15
57	11.38 ± 1.55	9.10 ± 3.19	22.01 ± 3.24	74.71 ± 33.01	27.57 ± 5.61	152.83 ± 99.47
60	11.05 ± 2.23	9.60 ± 4.23	21.36 ± 2.63	64.56 ± 22.13	25.26 ± 4.13	116.29 ± 69.49
61	10.41 ± 1.30	8.05 ± 12.03	22.34 ± 2.99	86.22 ± 26.22	30.40 ± 7.90	171.98 ± 89.80
63	7.09 ± 1.34	2.99 ± 1.22	20.38 ± 2.59	59.48 ± 26.75	27.21 ± 4.90	148.12 ± 89.72
69	9.02 ± 0.98	3.35 ± 1.19	21.80 ± 3.17	62.87 ± 24.24	27.20 ± 4.64	128.76 ± 75.42
对照组 control	11.93 ± 2.08	10.25 ± 5.10	21.94 ± 3.44	71.88 ± 33.26	26.27 ± 4.74	128.27 ± 79.36

表 2 半滑舌鲷不同家系鱼苗存活率和相对增重率比较
Tab.2 Comparison of survival rate and RWGR of different families of *C. semilaevis*

家系号 family no.	存活率/% survival rate	相对增重率/(g/d) RWGR	家系编号 family no.	存活率/% survival rate	相对增重率/(g/d) RWGR
3	41.0	0.34	39	46.5	0.44
4	65.5	0.31	40	52.5	0.46
5	49.5	0.40	43	15.0	0.25
6	59.0	0.44	44	46.0	0.46
7	33.5	0.38	56	27.0	0.27
14	21.0	0.42	57	45.0	0.48
16	73.0	0.81	60	26.0	0.36
17	75.0	0.45	61	28.0	0.56
20	42.5	0.26	63	14.0	0.48
21	50.5	0.52	69	18.5	0.42
28	43.0	0.53	对照组 control	38.0	0.39
38	15.3	0.40			

表 3 半滑舌鲷不同家系鱼苗全长和体质量比较
Tab.3 Comparison of body length and body weight of different families of *C. semilaevis*

家系号 family no.	平均全长/cm average length	平均体质量/g average weight	家系号 family no.	平均全长/cm average length	平均体质量/g average weight
3	26.05 ± 3.70	125.89 ± 49.96	39	29.50 ± 5.89	155.76 ± 92.71
4	25.66 ± 2.42	111.22 ± 31.88 *	40	28.14 ± 6.15	158.64 ± 40.81
5	26.04 ± 5.21	137.82 ± 104.22	43	25.56 ± 3.22	94.71 ± 48.14 *
6	27.51 ± 4.17	148.29 ± 90.53	44	29.42 ± 5.43	156.45 ± 99.17
7	26.35 ± 3.63	129.31 ± 71.21	56	26.78 ± 3.02	103.07 ± 36.79 *
14	27.93 ± 3.96	152.35 ± 77.95	57	30.24 ± 6.16	167.64 ± 109.11 **
16	32.70 ± 6.95	263.47 ± 157.88 **	60	27.21 ± 4.45	125.26 ± 74.85
17	27.90 ± 4.34	148.14 ± 71.01	61	33.23 ± 8.76	187.95 ± 98.20 **
20	25.39 ± 2.71	97.07 ± 31.69 **	63	30.02 ± 5.41	163.37 ± 98.95 *
21	29.90 ± 3.69	167.34 ± 66.68 **	69	30.23 ± 5.16	143.06 ± 83.80
28	29.72 ± 5.55	173.98 ± 108.20 **	对照组 control	27.34 ± 4.87	133.37 ± 81.99
38	29.65 ± 5.51	144.13 ± 80.04			

注: * 表示体质量与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$); ** 表示体质量与对照组相比差异极其显著 ($P < 0.01$)。

Notes: * indicates difference is significant at the 0.05 level; ** indicates difference is significant at the 0.01 level.

2.3 半滑舌鲷不同家系的性别比例及性转化率

选取了 5 个正常雄鱼家系和 5 个伪雄鱼家系进行生理性别和遗传性别检测,5 个正常雄鱼家系的生理雌鱼比例存在较大差异,分布范围为 31.43% ~ 55.96%,其平均数为 42.94%;不同家系由遗传型雌鱼性反转为生理雄鱼的比例存在明显差别,性反转比例最低为 1.61%,最高为 31.25%,其平均值为 14.08% (表 4)。同时,发现 5 个伪雄鱼家系的生理雌鱼比例都很低,平均值为 4.45%,明显低于正常雄鱼后代家系的生理雌鱼比例 ($P < 0.01$),其中绝大多数遗传雌鱼性反转为生理雄鱼,其性反转比例高达 91.41%,这个比例明显高于正常雄鱼后代家系的性反转比例 (14.08%, $P < 0.01$)。

16 号家系生理雌鱼比例最高,生长速度最快,日增重最高,其次是 61 号家系,其生理雌鱼比例为 51.90%,日增重为 0.56 g,体质量极明显高于对照组 ($P < 0.01$)。结果显示,16 和 61 号家系生长速度快与其雌鱼比例成正相关的。同时,还可以看出,5 个伪雄鱼家系 (3、4、7、20 和 56 号) 鱼苗的生长速度都很慢,其相对增重率仅为 0.26 ~ 0.38 g/d,均低于对照组,其中 4 号和 56 号家系的平均体质量显著低于对照组 ($P < 0.05$),20 号家系极显著低于对照组 ($P < 0.01$)。由此表明,由于不同家系的生理雌鱼比例以及生长状况不同,通过家系选育,可以筛选出生理雌鱼比例高、生长速度快、养殖产量高的半滑舌鲷家系。

表 4 半滑舌鲷家系生理和遗传性别比例及性反转率
 Tab. 4 The ratio of phenotypic female, genotypic female and sex reversal in several typical families of *C. semilaevis*

家系和家系号 families and family number	检测鱼总数 total number	生理雌鱼数量 the number of phenotypic female	生理雌鱼比例/% the ratio of phenotypic female	遗传雌性比例/% the ratio of genotypic female	性反转率/% the ratio of reversal	
	5	56	22	39.26	46.42	15.38
	16	109	61	55.96	56.88	1.61
正常雄鱼家系 the normal male family	38	35	11	31.43	45.71	31.25
	57	51	23	45.10	47.06	4.17
	61	79	41	51.90	63.29	18.00
	平均数 average			42.94 ± 10.33	51.87 ± 7.85	14.08 ± 11.89
	3	35	1	2.86	40.00	92.86
	4	131	17	12.97	54.20	76.06
伪雄鱼家系 the neo-male family	7	35	1	2.86	48.57	94.11
	20	84	3	3.57	59.50	94.00
	56	36	0	0.00	44.44	100.00
	平均数 average			4.45 ± 4.96 **	49.34 ± 7.72	91.41 ± 9.02 **

注: * 表示与正常雄鱼家系相比差异显著 ($P < 0.05$); ** 表示与正常雄鱼家系相比差异极其显著 ($P < 0.01$)。

Notes: * indicates difference is significant at the 0.05 level; ** indicates difference is significant at the 0.01 level.

3 讨论

半滑舌鲷是我国海水养殖鱼类的主导品种之一,但半滑舌鲷雌雄生长差异大、雌性比雄性生长快 2~4 倍,由于雄性生长缓慢、个体小,不受养殖者和消费者欢迎,同时,在半滑舌鲷养殖中还观察到一个现象,就是在半滑舌鲷普通养殖苗种中,普遍存在着雄性个体比例达 70%~90%,而雌鱼比例仅为 10%~30% 的现象,这个问题不仅严重限制了半滑舌鲷苗种的推广,而且影响了养殖户的积极性和半滑舌鲷养殖产业的发展。查明这个问题,不仅对于半滑舌鲷性别决定和分化的基础研究具有重要意义,而且对于提高半滑舌鲷苗种的雌鱼比例,提高养殖产量和经济效益具有应用价值。而要查明这个问题,必须对养殖群体的遗传性别和生理性别进行鉴定。为了排除亲鱼个体之间的差异,通过建立家系,对不同家系鱼苗的遗传性别和生理性别进行鉴定,就有可能查明鱼苗中遗传性别和生理性别的一致性,查明高比例雄鱼的来源。Chen 等^[2-3]相继筛选到半滑舌鲷雌性特异 AFLP 标记和性别连锁微卫星标记,从而为研究半滑舌鲷不同家系性别比例提供了可能。本实验通过构建半滑舌鲷正常雄鱼和伪雄鱼家系,采用性别连锁微卫星标记对半滑舌鲷不同家系的性别比例及其生长性能进行了系统研究,首次发现半滑舌鲷伪雄鱼后代家系的生理雌鱼比例明显

低于正常雄鱼后代家系,伪雄鱼后代家系中平均 90% 以上的遗传雌鱼性反转为伪雄鱼;同时发现不同正常雄鱼家系鱼苗的生理雌鱼比例也有一定差异,通过家系选育方式可以筛选出雌性比例高、生长速度快的家系,从而为解决半滑舌鲷苗种中雄鱼比例高的问题提供了新的途径。

鱼类性别决定类型主要包括基因决定型 (GSD)、环境(主要是温度)决定型 (TSD) 及基因-环境共同决定型三大类^[13-14]。将牙鲆鱼苗养殖在高温和低温环境中,产生生理雄性鱼苗的比例明显大,而只有在中间温度,雌雄鱼苗的比例才为 1:1^[15]。罗非鱼的性别分化也受环境影响很大,高水温养殖提高尼罗罗非鱼的雄性比例,例如在 36.9 °C 的高温下处理过的罗非鱼苗种中的雄鱼比例高达 64.2%~80%,明显高于在 36 °C 以下养殖的罗非鱼中的雄鱼比例^[16]。邓思平等^[12]发现,半滑舌鲷鱼苗在 26~28 °C 的高温下养殖后雄鱼比例明显升高。本研究进一步发现,半滑舌鲷不同家系鱼苗在普通养殖水温 (20~24 °C) 下育苗和养殖后也有不同比例的遗传雌性鱼苗发育为生理雄鱼,尤其是伪雄鱼后代家系鱼苗中约有 90% 的遗传雌性个体发育为生理雄鱼,其遗传性别和生理性别出现严重偏差。这种现象在其它鱼类也曾出现过,例如, Nakayama 等^[17]通过分子杂交发现 Z 和 W 染色体间会发生交换,形成特殊的 W 染色体导致性别表型和性别遗传型的不一致。

但半滑舌鳎伪雄鱼后代中 90% 的遗传雌性发育为生理雄鱼的现象出现的原因有待进一步研究。

半滑舌鳎性别决定类型为 ZW 型,其雌性个体含有 ZW 性染色体,其中 W 染色体比 Z 染色体明显大^[11,18]。半滑舌鳎伪雄鱼具有 ZW 染色体类型,因此从理论上讲,伪雄鱼后代的遗传雌性比例应该为 67%~75%,但本研究发现 5 个伪雄鱼家系的遗传雌性比例平均为 49.34%,与正常雄鱼家系 51.87% 的遗传雌性比例相比没有显著差别,这可能是由于 WW 超雌个体不能成活所造成的,或者是由于 Z 和 W 染色体间发生重组交换,形成了特殊的 W 染色体导致性别表型和性别遗传型的不一致,或者是由于其它原因造成,有待今后进一步研究。

本研究表明,半滑舌鳎不同正常雄鱼家系的遗传雌鱼比例绝大多数在 50%,差异不明显,但生理雌鱼比例在不同家系间存在较大差异。例如,16 号家系的生理雌鱼比例高达 55.96%,而 38 号家系的生理雌鱼比例只有 31.43%。与此相类似, Vandeputte 等^[19] 在欧洲鲈 (*Dicentrarchus labrax*) 也发现不同家系鱼苗的雌雄比例表现出显著差异。Wessels 等^[9] 在罗非鱼不同家系中也观察到性别比例差异显著的现象。另外,本研究发现半滑舌鳎不同家系生理雌鱼比例的差异是由于不同的性反转比例所造成,但是,不同正常雄鱼家系鱼苗的自然性反转比例的差异,是由于不同家系对环境影响的反应不尽相同,还是由于其它原因造成有待进一步研究。本研究表明通过半滑舌鳎家系选育可以筛选出生长快并且生理雌鱼比例高的家系,通过提高雌鱼比例有望培育出高雌性品系,从而为解决半滑舌鳎普通苗种中雌鱼比例低的问题提供了有效的技术手段,这对培育半滑舌鳎优良品种,提高半滑舌鳎的生长速度和养殖产量具有重要意义和应用价值。

参考文献:

- [1] Ji X S, Liu H W, Chen S L, et al. Growth differences and dimorphic expression of growth hormone (GH) in female and male *Cynoglossus semilaevis* after male sexual maturation [J]. *Marine Genomics*, 2011, 4 (1): 9 - 16.
- [2] 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.
- [3] Chen S L, Ji X S, Shao C W, et al. Induction of mito-gynogenetic 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.
- [4] 季相山, 陈松林, 马洪雨, 等. 半滑舌鳎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 - 335.
- [5] Chen S L, Tian Y S, Yang J F, et al. Artificial gynogenesis and sex determination in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. *Marine Biotechnology*, 2009, 11 (2): 243 - 251.
- [6] 陈松林, 田永胜, 徐田军, 等. 牙鲆抗病群体和家系的建立及其生长和抗病性能初步测定 [J]. *水产学报*, 2008, 32 (5): 665 - 673.
- [7] Xu T J, Chen S L, Ji X S, et al. MHC polymorphism and disease resistance to *Vibrio anguillarum* in 12 selective Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) families [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 25 (3): 213 - 221.
- [8] 陈松林, 杜民, 杨景峰, 等. 半滑舌鳎家系建立及其生长和抗病性能测定 [J]. *水产学报*, 2010, 34 (12): 1789 - 1794.
- [9] Wessels S, Horstgen-Schwark G. Selection experiments to increase the proportion of males in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by means of temperature treatment [J]. *Aquaculture*, 2007, 272 (1): S80 - S87.
- [10] 李虎, 陈四清, 刘海金, 等. 半滑舌鳎养殖群体的性比与雌雄形态差异比较 [J]. *水产学报*, 2012, 36 (9): 1331 - 1336.
- [11] 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.
- [12] 邓思平, 陈松林, 田永胜, 等. 半滑舌鳎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.
- [13] Devlin R H, Nagahama Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences [J]. *Aquaculture*, 2002, 208 (3): 191 - 364.
- [14] Baroiller J F, D' Cotta H. Environment and sex determination in farmed fish [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology and Pharmacology*, 2001, 130 (4): 399 - 409.
- [15] Yamamoto E. Studies on sex-manipulation and production of cloned populations in hirame,

- Paralichthys olivaceus* [J]. Aquaculture, 1999, 173 (1 - 4): 235 - 246.
- [16] Azaza M S, Dhraief M N, Kraiem M M. Effects of water temperature on growth and sex ratio of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* reared in geothermal waters in southern Tunisia [J]. Journal Thermal Biology, 2008, 33 (2): 98 - 105.
- [17] Nakayama I, Foresti F, Tewari R, et al. Sex chromosome polymorphism and heterogametic males revealed by two cloned DNA probes in the ZW/ZZ fish *Leporinus elongatus* [J]. Chromosoma, 1994, 103 (1): 31 - 39.
- [18] Shao C W, Wu P F, Wang X L, et al. Comparison of chromosome preparation methods for the different developmental stages of the half-smooth tongue sole, *Cynoglossus Semilaevis* [J]. Micronology, 2010, 41 (1): 47 - 50.
- [19] Vandeputte M, Dupont-Nivet M. A polygenic hypothesis for sex determination in the European sea bass *Dicentrarchus labrax* [J]. Genetics, 2007, 176 (2): 1049 - 1057.

Selection of the families with high growth rate and high female proportion in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)

CHEN Songlin^{1*}, LI Yangzhen^{1,2}, ZHANG Jing^{1,2}, LIU Shoutang³, SUN Deqiang³, DU Min¹, LIANG Zhuo¹, LIU Feng^{1,2}, HU Qiaomu^{1,2}, SHAO Changwei¹, LIU Shanshan¹

(1. Key Laboratory for Sustainable Development of Marine Fishery, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;
2. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
3. Haiyang Yellow Sea Aquatic Product Co., Ltd., Shandong Province, Haiyang 265122, China)

Abstract: The present study aims to uncover the relationship between the phenotypic sex and genotypic sex and the growth rate of male and female half-smooth tongue sole and to select the excellent families with high female proportion. In this paper, we firstly established 22 half-smooth tongue sole families which were cultured in the same pond. Secondly, we identified the offspring's phenotypic sex and genotypic sex of 5 normal male families and 5 neo-male families. This study shows that there are significant differences not only in growth rate but also in proportion of male to female. Two fast-growing families (No. 16 and No. 61) whose relative weight gain rate were 0.81 g/d and 0.56 g/d and 4 relatively fast-growing families (No. 21, No. 28, No. 57 and No. 63), the relative weight gain rate ranges from 0.48 g/d to 0.53 g/d were selected; 12 commonly-growing and 4 slow-growing families were selected also. The average ratios of genotypic female and phenotypic female of the 5 normal male (ZZ) families were 51.87% and 42.94%, and the ratio of genotypic female reversing to phenotypic male was 14.08%. Instead, the average genotypic female and phenotypic female ratio of the 5 neo-male (ZW) families was 49.34% and 4.45%, respectively, and the ratio of genotypic female reversing to phenotypic male was 91.41%. In the present study we found for the first time that there were significant differences in phenotypic sex ratio between different families. We also found that the genotypic females in neo-male families were more easily reversed to phenotypic males, which increased the number of phenotypic males in cultured populations. It initially showed that the families with high female proportion and fast growing rate could be selected via family selection, which could provide theories and new technical methods for the breeding and the production of high quality seeding of half-smooth tongue sole.

Key words: *Cynoglossus semilaevis*; family; growth trait; sex; selective breeding

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