

文章编号: 1000-0615(2018)04-0557-08

DOI: 10.11964/jfc.20170410813

白斑狗鱼雌性化诱导和雌雄同体现象

张俊杰*, 胡琼, 管潇萌, 李飞, 王明坤, 李胜忠

(新疆农业大学动物科学学院, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐 830052)

摘要: 为研究和开发白斑狗鱼雌性化诱导方法, 实验将750尾白斑狗鱼仔鱼随机分为5组, 其中4组为实验组, 分别从不同的发育时间(孵出后第10、20、30和40天)开始投喂用20 mg/L雌二醇浸泡过的水蚯蚓, 另外1组为空白对照组, 投喂正常水蚯蚓。各实验组喂饲17 β -雌二醇30 d, 然后将实验组和对照组的所有鱼进行正常饲养。至206 d将实验组和对照组的鱼进行成活情况统计, 然后分别进行解剖, 取出性腺进行组织学观察。结果显示, 投喂用20 mg/L雌二醇浸泡过的水蚯蚓对白斑狗鱼仔鱼具有非常明显的致死效应, 成活率由对照组的43.5%下降到14.3% \pm 8.3%; 30 d喂药组和40 d喂药组获得较高的雌雄比例, 特别是30 d喂药组最高, 达到了15:7, 由此推断白斑狗鱼性腺分化的关键时间点可能在孵出后的30~40 d; 各实验组和对照组都出现很高比例的雌雄同体现象, 即在同一性腺中同时出现了大量的初级卵母细胞(第II时相)和精母细胞, 而且这些卵母细胞有明显的退化现象, 推测其性别分化过程中存在雌性先熟的幼体雌雄同体现象。本研究将为采用激素诱导手段生产白斑狗鱼全雌化苗种以及探讨白斑狗鱼性别决定和分化机制提供依据。

关键词: 白斑狗鱼; 17 β -雌二醇; 雌性化诱导; 雌雄同体

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

白斑狗鱼(*Esox lucius*)隶属鲑形目(Salmoniformes)、狗鱼科(Esocidae)、狗鱼属(*Esox*), 自然分布于亚洲、欧洲和北美洲北部的冷水水域, 在我国仅分布于新疆北部额尔齐斯河流域, 在新疆阿勒泰地区俗称乔尔泰。白斑狗鱼属于亚冷水性肉食性鱼类, 其生长速率快、肉质坚韧少刺、味道鲜美、营养丰富, 是人们非常喜爱的优质食用鱼类和重要经济鱼类^[1]。近年来, 白斑狗鱼作为一种大型、长寿命、反复生殖和顶端捕食鱼类, 在生态学和进化生物学等领域已经成为广泛研究的一种模式生物^[2], 其全基因组测序等也有报道^[3]。研究表明, 白斑狗鱼雌鱼生长明显快于雄鱼, 而且性成熟更晚, 寿命更长^[4]。

鱼类作为低等脊椎动物, 其性别决定除受遗传因素的控制外, 外部环境因素如温度、外

源激素等也可在不同程度上影响其性别。通过激素处理在鱼类性别分化关键时期可以诱导鱼类形成不同于遗传性别的生理性别, 可以进行单性苗种的生产。1969年Yamamoto等^[5]用雌二醇成功将雄性青鳉(*Oryzias latipes*)转变为雌性, 从此激素性逆转的方法就开始被用于单性群体生产。近年来国内外学者在白斑狗鱼性别控制方面也已经开展了一些研究。Luczynski等^[6]对白斑狗鱼进行雌核发育诱导, 得到了全雌的白斑狗鱼雌核发育鱼苗, 并确定其雄性配子异型(XY)的染色体性别决定类型。Demska-Zakes等^[7]对白斑狗鱼鱼苗投喂11 β -羟雄烯二酮, 可以全部转化为雄性或间性。但迄今尚未有关于雌性激素对白斑狗鱼性别分化影响的报道。

本实验旨在通过在孵出后的不同时间对白

收稿日期: 2017-04-25 修回日期: 2017-08-27

资助项目: 国家自然科学基金(31660739); 新疆维吾尔自治区高校科研项目(XJEDU2016I021); 新疆农业大学大学生创新项目(201610758124)

通信作者: 张俊杰, E-mail: zhangjuji@sina.cn

斑狗鱼仔鱼投喂含有 17β -雌二醇的饵料, 研究雌二醇对白斑狗鱼幼鱼性别分化及存活率的影响, 并由此推断白斑狗鱼性腺分化的关键时间节点, 为采用激素诱导等技术手段生产白斑狗鱼全雌化苗种以及深入探讨白斑狗鱼性别决定机制提供一定依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用鱼为本实验室人工繁殖的白斑狗鱼仔鱼, 繁殖所用亲鱼为2016年4月12日购自乌鲁木齐北园春市场的乌伦古湖野生白斑狗鱼, 雄鱼体质量为1.2 kg, 雌鱼体质量为2.1 kg, 身体健康无病且发育成熟。在避光房间内通过人工采卵和采精, 通过干法完成人工授精, 然后将受精卵平铺于孵化篮中, 悬浮在盛水约50 L的水桶中进行孵化, 并用增氧机不间断增氧。孵化期间对房间采取必要的避光措施, 受精卵于4月20日前后陆续孵出。

在仔鱼孵出后和实验期间采用循环水充氧水箱进行流水养殖, 每个水箱水体约40 L, 日水交换次数为5次。实验初期水温 $11\sim 12\text{ }^{\circ}\text{C}$, 基本不换新水, 中后期逐渐升高到 $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右, 每10天左右换水约30%。在孵出后4 d左右开始投喂人工孵化的卤虫, 第10天开始投喂切碎的水蚯蚓(*Tubifex hattai*), 并根据鱼苗的不断生长, 逐渐过渡到完整的水蚯蚓, 并持续到实验结束, 每天投喂2次。

本实验所用 17β -雌二醇购自上海源叶生物科技有限公司。将 17β -雌二醇溶于无水乙醇中, 配成 1 mg/mL 的储备液(保存于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中), 每次投喂前用自来水将储备液进行50倍稀释, 获得 20 mg/L 的使用液。将水蚯蚓和 17β -雌二醇使用液按1:5的比例混合, 浸泡1 h, 然后滤去液体, 将水蚯蚓切碎或完整地投喂到各水箱中, 投喂量以0.5 h吃完为宜。如果0.5 h没有吃完, 及时用手抄网将剩余的水蚯蚓捞走, 防止水蚯蚓体内 17β -雌二醇充分散失后再被仔鱼摄食。

1.2 实验方法

实验开始前将750尾仔鱼分为5组, 每组的初始仔鱼尾数为150尾(分别饲养在3个相同的水箱中, 每个水箱50尾)。5组中前4组为实验组, 分别在孵出后的第10、20、30和40天开始, 投喂

经雌二醇浸泡的水蚯蚓, 喂药期为30 d, 喂药期结束后投喂普通的水蚯蚓; 第5组为空白对照组, 只投喂普通的水蚯蚓。

整个实验过程中, 观察、记录各组仔鱼的反应, 特别是死亡情况。2016年11月11日, 当仔鱼培育到206 d后将鱼解剖, 取出性腺, 并参考刘筠^[8]的标准对它们进行分期。然后将性腺置于Bouin氏液固定, 再经乙醇梯度脱水、二甲苯透明和石蜡包埋后, 进行连续切片, 切片厚度为 $6\text{ }\mu\text{m}$, 经H.E染色, 在Motic光学显微镜下进行观察和拍照, 参考文献[8-10]方法进行性别和雌雄同体的判断, 并计算各组的性别比例。

2 结果

2.1 投喂 17β -雌二醇对白斑狗鱼成活率的影响

实验期间, 4个喂药实验组开始饲喂雌二醇的时间不同, 喂药后出现应激反应和死亡的情况基本一致, 都在开始投喂后的6~8 d后出现显著的死亡现象。先是仔鱼表现出强烈的异常反应, 频繁地狂游, 摄食量减少, 甚至停止摄食, 最后停在箱底一动不动, 多在1~2 d内死亡。另外, 在实验期间, 第20天喂药组的3个饲养箱中有2箱在实验中期全部缺氧死亡, 40 d喂药组和空白对照组也分别因鱼跳出水箱、停电缺氧等非实验因素导致部分水箱内的部分实验鱼非正常死亡。因此, 20 d喂药组、40 d喂药组和空白对照组需扣除这些非正常死亡鱼的数量, 各组的有效实验鱼数量分别为50、107和131尾(表1)。

培育到206 d后结束实验, 统计各组成活情况, 根据各组有效实验鱼数量和最终成活数量计算出各组的成活率(表1)。4个喂药组的最终成活率都明显低于空白对照组, 说明本实验中投喂含 20 mg/L 雌二醇的水浸泡过的水蚯蚓, 对白斑狗鱼具有明显的致死作用。

2.2 白斑狗鱼的性别鉴定与雌雄同体

培育到206 d后, 将各组实验鱼捞出, 此时的白斑狗鱼处于幼鱼期, 体质量约15 g左右。解剖取出性腺, 此时的性腺仍为细带状, 呈肉红色, 初步判断属II期性腺, 但肉眼难以判断出雌雄。对性腺进行固定和组织切片, 显微镜下观察发育情况, 并对每条鱼的性别进行判断。结果发现在全部117尾鱼中, 只有19尾鱼性腺表现

表 1 白斑狗鱼雌性化诱导实验中各组的有效实验鱼数量、最终成活数量及成活率

Tab. 1 Valid experimental fish amounts, final survival amounts and survival rates of all groups in the feminization induction experiment of *E. lucius*

组别 grouping	实验组 experimental groups				空白对照组 control group
	10 d喂药组 group feeding medicine from 10 days	20 d喂药组 group feeding medicine from 20 days	30 d喂药组 group feeding medicine from 30 days	40 d喂药组 group feeding medicine from 40 days	
有效鱼数量/尾 valid amounts of fish	150	50	150	107	131
成活数量/尾 survival amounts	8	11	31	10	57
成活率/% survival rates	5.3	22.0	20.7	9.3	43.5
平均成活率*/% average survival rates*	14.3±8.3				43.5

注: *表示有显著性差异($P<0.05$)

Notes: * means significant differences ($P<0.05$)

为单一性别, 其中6尾为纯雌性, 13尾为纯雄性, 其余98尾鱼的性腺都不同程度地同时出现卵母细胞和精母细胞, 表现为卵巢组织和精巢组织同时出现在一条鱼的性腺中, 即出现大量的雌雄同体现象(图1)。本实验根据不同个体中2种性腺组织的比例不同, 将它们分为3类。

雌雄同体 在性腺组织切片中, 观察到有大量的初级卵母细胞(面积占切片的20%~80%)与大量的精母细胞共同存在于同一条鱼的性腺组织中, 其中卵母细胞位于性腺的外侧, 而精母细胞位于性腺的内侧, 也有些性腺是精母细胞混合分布在卵母细胞之间。在这些性腺中还可以看到很多可能是由于退化萎缩而使细胞核染色加重和在细胞质中出现较大间隙的卵母细胞(图1)。

雌性 指性腺切片中至少有80%以上的组织为初级卵母细胞所占据, 表现为雌性组织, 其中的卵母细胞数量多, 并多位于性腺外侧, 一般没有或者有极少量的精原或精母细胞, 在外壁与内侧壁之间有完整的卵巢腔(OC)(图2)。

雄性 即在观察的性腺组织切片中, 主要(80%以上)或只含有精母细胞, 很少或者没有卵母细胞或卵原细胞。输精管可能是由原始卵巢腔转化而来, 形状还与卵巢腔相似, 但腔体明显减小。在大量的实质样组织中, 有的区域已经形成精小囊, 其中集中分布着大量精母细胞, 有的区域尚未形成精小囊, 只有分散的精母细胞(图3)。

2.3 17 β -雌二醇对白斑狗鱼性别比例的影响

根据如上所述的性别判断标准, 对本研究

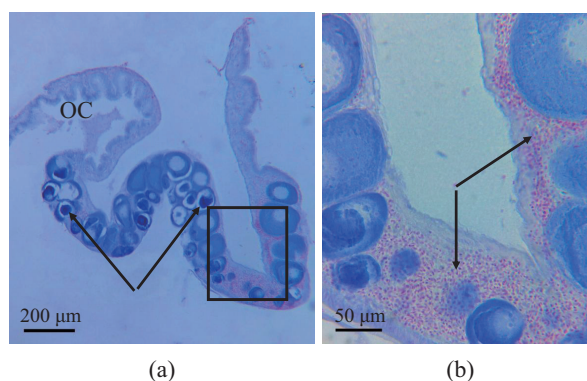


图 1 雌雄同体白斑狗鱼的性腺组织切片

(a)雌雄同体白斑狗鱼的性腺组织切片轮廓, 示排列在性腺外侧的一些初级卵母细胞和分散分布在卵母细胞之间的大量精母细胞。由于取样时性腺被撕破, 只显示出部分卵巢腔(OC)。箭头所指的几个卵母细胞可能是由于萎缩而出现细胞核染色加重和细胞质中出现较大的间隙。(b) a图中方框区域的进一步放大。箭头所指区域清晰显示密集分布在一些卵母细胞之间的大量的精母细胞

Fig. 1 Histological observation of gonads in hermaphroditic *E. lucius*

(a) indicated the outline of hermaphroditic *E. lucius* gonads, showing some primary oocytes ranking in the exterior of gonad and lots of spermatozoa dispersing among oocytes. Only a part of ovarian cavity (OC) was shown because the gonad was torn at the time of sampling. Aggravated nuclear staining and greater intervals appeared in the cytoplasm of several oocytes indicated with arrows, probably due to degeneration. (b) shown further being magnified of the region located in square frame of figure (a). There were a great deal of spermatozoa, indicated with arrows, distributing densely among some oocytes in the region

最后存活的所有白斑狗鱼性腺样品进行分析和归类, 得到各组的性别分布情况(图4)。从这些性别统计结果中可以发现, 除10 d喂药组的雌雄数量相等(2:2)外, 其他4组中都是雌性数量高

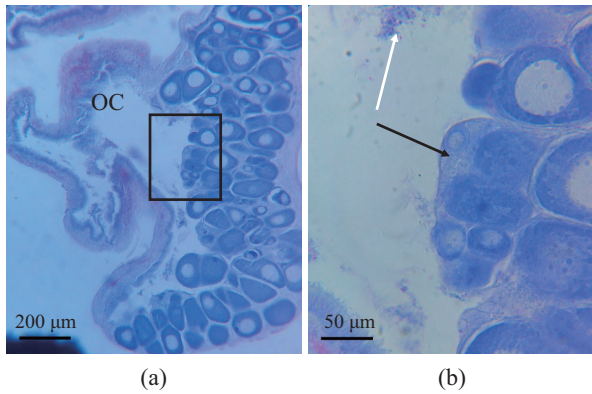


图2 雌性白斑狗鱼的性腺组织切片

(a)雌性白斑狗鱼性腺组织切片轮廓图, 示分布在性腺外侧的大量初级卵母细胞和位于卵母细胞与内侧壁之间完整的卵巢腔(OC)。(b)a图中方框区域的进一步放大。黑色箭头显示成簇集中分布的卵原细胞和卵母细胞, 白色箭头显示在卵巢中少量分布的疑似精子细胞

Fig. 2 Histological observation of gonad in female *E. lucius*

(a) indicated the histological section outline of female *E. lucius* gonad, showing lots of primary oocytes ranking in the exterior of gonad and the ovarian cavity (OC) existing between these primary oocytes and medial wall. (b) shown further being magnified of the region located in square frame of figure (a). Black arrows indicated oogoniums and oocytes distributing collectively and white arrows indicated a few suspectable spermatocytes distributing in ovary

于雄性, 但20 d喂药组和对照组中雌雄数量比较接近(分别为3:2和17:15), 其次是40 d喂药组雌雄比例达到了5:3, 而在30 d喂药组中雌雄比例相差最多, 达到了15:7。

本研究中各实验组和对照组都出现了相当比例的雌雄同体, 其中20 d喂药组比例最高, 达到55%, 其次是10 d喂药组为50%, 作为对照组的样品中也出现很高比例(44%)的雌雄同体现象, 而在30 d和40 d喂药组雌雄同体所占比例明显低于其他3组, 分别为29%和20%(图4)。

3 讨论

3.1 17β-雌二醇对白斑狗鱼存在明显的致死效应

17β-雌二醇作为天然激素, 是鱼类雌性化诱导研究中最常用的激素, 被广泛使用于鲤科(Cyprinidae)、鲑科(Salmonidae)、丽鱼科(Callichthyidae)^[11]、鲟科(Acipenseridae)^[12]等几十种类别的雌性化诱导实验中。但激素诱导鱼类性转化存在一个阈值, 处理强度在此值之内时对成活率无显著影响, 超过时会导致鱼类的成活率降低^[13]。

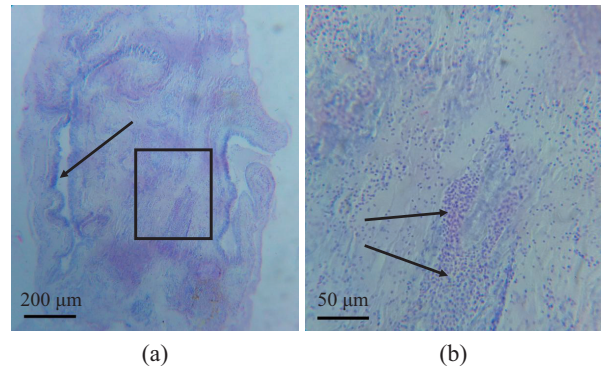


图3 雄性白斑狗鱼的性腺组织切片

(a)雄性白斑狗鱼的性腺组织切片轮廓图, 示性腺中广泛分布的精巢组织和其中的精母细胞, 黑色箭头表示由原始卵巢腔转化而来的可能的输精管。(b)a图中方框区域的进一步放大。黑色箭头显示在精小囊中集中分布的大量精母细胞

Fig. 3 Histological observation of gonad in male *E. lucius*

(a) indicated the histological section outline of male *E. lucius* gonad, showing spermary tissues widely distributing in the gonad. Black arrows indicated potential deferent duct transformed from primitive ovarian cavity. (b) shown further being magnified of the region located in square frame of figure a. Black arrows indicated great deals of spermatocytes distributing densely in spermary follicle

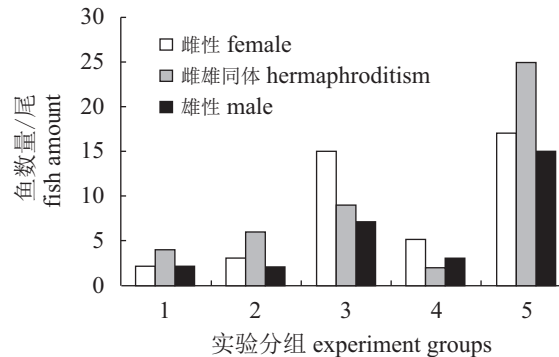


图4 各实验组和空白对照组成活白斑狗鱼性腺样品的性别判定结果

1. 10 d喂药组; 2. 20 d喂药组; 3. 30 d喂药组; 4. 40 d喂药组; 5. 空白对照组

Fig. 4 Results of sex examinations of gonad samples from survival *E. lucius* in all experiment groups and blank control group

1. group feeding medicine from 10 days; 2. group feeding medicine from 20 days; 3. group feeding medicine from 30 days; 4. group feeding medicine from 40 days; 5. blank control group

本实验用含约20 g/L雌二醇的水溶液浸泡过的水蚯蚓投喂白斑狗鱼, 导致了白斑狗鱼死亡率明显增加, 说明本实验所使用的剂量已经超过了白斑狗鱼可以承受的阈值。但张晓彦等^[14]使用30 g/L

浓度的雌二醇对孵化后 25~90 d 的半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)进行连续浸泡处理,并没有对鱼苗成活率表现明显影响,而且浸泡给药法的效率本身就比口服给药法高出200倍以上。本研究口服雌二醇引起白斑狗鱼大量死亡的原因有待进一步探讨。

3.2 17 β -雌二醇对白斑狗鱼的雌性化诱导效果

采用天然激素17 β -雌二醇是鱼类雌性化诱导研究最常用的方法,并在相关研究中已获得成功,有效地提高实验鱼类的雌性比例。如刘少军等^[15]用含有100 $\mu\text{g/g}$ 17 β -雌二醇的饲料投喂脱膜3 d 的革胡子鲶(*Clarias lazere*),连续投喂90 d,取得较高的性转化率。Lin等^[16]用含有80和120 mg/kg 17 β -雌二醇的饵料投喂体长为7.8~45 mm 的大西洋鳕(*Gadus morhua*),获得了显著的雌性化比例。Park等^[17]用40 $\mu\text{g/g}$ 的17 β -雌二醇浸泡处理出膜后3~20 d 的黄颡鱼(*Pseudobragrus fulvidraco*)可获得全雌后代。Hendry等^[18]用含有10 $\mu\text{g/g}$ 的17 β -雌二醇处理未分化的大西洋庸鲽(*Hippoglossus hippoglossus*),得到74%的雌性率;张晓彦等^[14]用不同浓度(1、3、10和30 g/L)的17 β -雌二醇浸泡25日龄半滑舌鳎,每天2 h,连续65 d,分别获得了74%、82%、88%和97%的雌性率。

本实验分别在白斑狗鱼孵出后的不同时间开始用 β -雌二醇进行雌性化诱导,在30和40 d 喂药组获得了相对较高比例的雌性白斑狗鱼,而且雌雄同体所占比例明显低于其他3组,尤其是30 d 喂药组雌性比例最高,表明在30和40 d 开始喂药明显影响了白斑狗鱼的性别比例,使得更多的雌雄同体白斑狗鱼向着雌性方向发育。由此推断白斑狗鱼性腺分化的关键时间点可能在孵出后的30~40 d。但本研究没有获得更高的雌性比例,可能是由于白斑狗鱼性腺发育存在雌雄同体现象,取样时间偏早所致,加上本研究所用的17 β -雌二醇浓度表现出强烈的致死作用,成活率低,也会影响诱导作用的发挥。另外白斑狗鱼作为亚冷水性鱼类,对激素的反应仍有待进一步研究。

由于鱼类性腺分化过程除了激素诱导影响外,可能还会受到其他环境因素(如温度、饵料及培养密度)的影响,如斑马鱼(*Danio rerio*)在22 $^{\circ}\text{C}$ 的水温条件下,可以产生87.1%的雄性个体,而在31 $^{\circ}\text{C}$ 的水温条件下,可以产生82.4%的雌性个体^[19]。

目前关于白斑狗鱼的性别分化过程与环境因素的关系少见报道,如果白斑狗鱼性别分化也与其他环境因素(如温度、饵料、培养密度及化学污染物等)有一定的关系,就可以考虑利用不同的环境条件(如不同温度)进行性别转化,将是一种比采用激素诱导手段更为安全的单性苗种生产途径,对白斑狗鱼全雌化生产和白斑狗鱼性别决定机制研究将产生积极的影响。

3.3 白斑狗鱼雌雄同体可能正处于性别转化过程中

雌雄同体是指在性腺内雄性生殖细胞和雌性生殖细胞并存的一种特殊现象^[8]。最常见的是在雌雄同体鱼类性腺中发生的功能性雌雄同体现象,同时或者依次产生成熟的雌雄生殖细胞^[20]。如雌性先熟的黄鳢(*Monopterus javanensis*),在其性成熟之前和第一次性成熟都表现雌性,性腺为卵巢,第一次繁殖过后通过雌雄同体转化为雄性^[21]。又如鲷科(Sparidae)鱼类第一次性成熟为雄性,第二次性成熟为雌性^[22]。另一种雌雄同体是指在鲱科(Clupeidae)^[23]、白斑狗鱼^[24]等雌雄异体鱼类成体中偶而存在的异常雌雄同体现象,其性腺中含有带成熟精子的精巢组织和已达卵黄阶段卵母细胞的卵巢组织。第三种是发生在雌雄异体鱼类如尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)^[8]、斑马鱼^[9]、苏门答腊四间鱼(*Barbus tetrazona tetrazona*)^[25]、条斑副绯鲤(*Parupeneus barberinus*)^[26]等鱼类性腺发育过程中的幼体雌雄同体现象,它们的性腺在分化开始时首先进行卵巢发育,然后大约一半个体通过卵母细胞退化和雄性化机制,经雌雄同体阶段转化为精巢。

对于白斑狗鱼,最早是1987年Agúndez等^[27]在西班牙埃斯拉河流域渔获物中发现3尾白斑狗鱼雌雄同体。1989年Dominguez等^[28]又报道了在该流域发现的18尾白斑狗鱼雌雄同体样品,占样品总量的0.94%。Vine等^[24]在调查英国污水处理厂对白斑狗鱼内分泌系统的影响时发现了16尾的雌雄同体样品,占样品总量的14%,但这些雌雄同体的出现与年龄和污水处理都没有关联。Demska-Zakes等^[7]用11 β -羟雄烯二酮对白斑狗鱼进行雄性化诱导研究中也发现了13%~17%的雌雄同体。

本研究中,虽然对照组和实验组雌雄同体比例不同,但都属于较高的水平,特别是对照

组出现了很高水平的雌雄同体现象(44%),这说明投喂雌二醇可能只影响了雌雄同体比例的高低,并不影响雌雄同体现象本身的出现,所以不论是否投喂雌二醇,这些实验用白斑狗鱼都会出现雌雄同体。本研究还发现,在很多雌雄同体性腺中不同程度地出现了卵母细胞退化现象,并存在明显的卵巢腔,说明这种雌雄同体为雌性先熟类型,而且这种现象出现在孵出后206 d,性腺尚处于发育Ⅱ期,属性未成熟阶段,表明白斑狗鱼的性腺发育过程同尼罗罗非鱼^[8]、斑马鱼^[9]、苏门答腊四间鱼^[25]和条斑副绯鲤^[26]等一样,属幼体雌雄同体现象。基于此判断,白斑狗鱼性腺在稚鱼时期首先进行卵巢样发育,然后性成熟之前的幼鱼期通过雄性化机制,使部分个体经过雌雄同体转化为雄性,而另一部分个体仍然保持雌性状态。但在池塘养殖群体和湖泊自然群体中的性腺发育过程是否也出现这种高比例的幼体雌雄同体现象,或雌雄同体现象与本研究所用实验条件(水温、水流、光照和水质等)是否存在关联有待进一步研究。

Goad^[29]研究表明,自然水体中的白斑狗鱼的雌雄性别比例虽然不是完全相等,但也比较接近1:1的水平。本实验对照组的57尾鱼中,2尾鉴定为纯雌性,8尾为纯雄性,其他47尾鱼都有不同程度的雌雄同体现象。如果这些雌雄同体个体全部转化为雄性个体,未来成鱼群体的雌雄比例将严重失调,达到55:2,由此推断这些雌雄同体正处于由雌性向雄性的动态转化过程,其中应该有一部分个体在雄性化机制消失后又回归到雌性状态。因此本实验将切片中含有80%以上卵巢组织的归为雌性,含有80%以上精巢组织的归为雄性,而只有介于20%~80%的归为雌雄同体,应该更能代表这些白斑狗鱼群体的性别。

王炬光^[30]研究表明,新疆乌伦古湖白斑狗鱼雌性最小性成熟个体的体质量为116.39 g,雄性最小性成熟个体的体质量为117.09 g。Dominguez等^[28]报道的18尾白斑狗鱼中低于100 g的有4尾,最小的为14 g,这些个体应处于性成熟前期,属于幼体雌雄同体。Demska-Zakes等^[7]进行白斑狗鱼鱼苗雄性化诱导研究中的仔鱼处于孵出后的169 d,体质量为23.48~89.64 g,其发现的雌雄同体也应该是幼体雌雄同体。在白斑狗鱼成体中也偶而存在有异常雌雄同体现象,如Vine

等^[24]在英国发现的16尾雌雄同体样品中,大多数为已经性成熟的成鱼。Dominguez等^[28]报道的18尾雌雄同体白斑狗鱼中,400 g以上的有5尾,最大的为820 g,这些个体很可能已经性成熟,它们的雌雄同体现象应该属于异常雌雄同体。白斑狗鱼性腺发育的具体过程还有待通过组织学来研究。

综上所述,本实验在白斑狗鱼孵出后的第10、20、30和40天,投喂经20 mg/L雌二醇浸泡过的水蚯蚓进行雌性化诱导,导致了白斑狗鱼成活率明显降低;30 d喂药组和40 d喂药组获得较高的雌雄比例,特别是30 d喂药组最高,达到了15:7,由此推断白斑狗鱼性腺分化的关键时间点可能在孵出后的30~40 d时间段内;各实验组和对照组都出现很高比例的雌雄同体现象,推测其性别分化过程中存在雌性先熟的幼体雌雄同体现象。

参考文献:

- [1] 郭焱. 新疆鱼类志[M]. 乌鲁木齐: 新疆科学技术出版社, 2012: 19-23.
Guo Y. Fishes in Xinjiang[M]. Urumqi: Xinjiang Science and Technology Press, 2012: 19-23 (in Chinese).
- [2] Forsman A, Tibblin P, Berggren H, et al. Pike *Esox lucius* as an emerging model organism for studies in ecology and evolutionary biology: a review[J]. Journal of Fish Biology, 2015, 87(2): 472-479.
- [3] Rondeau E B, Minkley D R, Leong J S, et al. The genome and linkage map of the northern pike (*Esox lucius*): conserved synteny revealed between the Salmonid Sister Group and the Neoteleostei[J]. PLoS ONE, 2014, 9(7): e102089.
- [4] Neumann R M, Willis D W, Sammons S M. Seasonal growth of northern pike (*Esox lucius*) in a South Dakota Glacial Lake[J]. Journal of Freshwater Ecology, 1994, 9(3): 191-196.
- [5] Yamamoto T, Kajishima T. Sex differentiation[M]//Hoar W S, Randall D J. Fish Physiology, Volume II: The Endocrine System. New York: Academic Press, 1969: 117-175.
- [6] Luczynski M J, Dabrowski K, Kucharczyk D, et al. Gynogenesis in northern pike: UV-inactivation of spermatozoa and the heat shock inducing meiotic diploidization [J]. Environmental Biotechnology, 2007, 3(2): 39-43.
- [7] Demska-Zakes K, Krol J, Luczynski M J, et al. Mas-

- culinization of northern pike fry using the steroid 11 β -hydroxyandrostenedione[J]. North American Journal of Aquaculture, 2000, 62(4): 294-299.
- [8] 刘筠. 中国养殖鱼类繁殖生理学[M]. 北京: 农业出版社, 1993: 20-42.
- Liu Y. Propagation Physiology of Main Cultivated Fish in China[M]. Beijing: Agricultural Publishing Press, 1993: 23-32(in Chinese).
- [9] Takahashi H. Juvenile Hermaphroditism in the zebrafish, *Brachydanio rerio*[J]. Bulletin of Faculty of Fisheries Hokkaido University, 1977, 28(2): 57-65.
- [10] Sadovy Y, Shapiro D Y. Criteria for the diagnosis of hermaphroditism in fishes[J]. Copeia, 1987(1): 136-156.
- [11] Pandian T J, Sheela S G. Hormonal induction of sex reversal in fish[J]. Aquaculture, 1995, 138(1-4): 1-22.
- [12] Omoto N, Maebayashi M, Mitsuhashi E, *et al.* Effects of estradiol-17 β and 17 α -methyltestosterone on gonadal sex differentiation in the F₂ hybrid sturgeon, the bester[J]. *Fisheries Science*, 2002, 68(5): 1047-1054.
- [13] Blázquez M, Zanuy S, Carrillo M, *et al.* Structural and functional effects of early exposure to estradiol-17 β and 17 α -ethynylestradiol on the gonads of the gonochoristic teleost *Dicentrarchus labrax*[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1998, 18(1): 37-47.
- [14] 张晓彦, 刘海金. 17 β -雌二醇对半滑舌鲷性分化 and 生长的影响[J]. 东北农业大学学报, 2009, 40(6): 67-72.
- Zhang X Y, Liu H J. Effects of 17 β -estradiol on sex differentiation and growth in half-smooth tongue-sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2009, 40(6): 67-72(in Chinese).
- [15] 刘少军, 刘筠. 雌二醇诱导革胡子鲶性转化及性腺观察[J]. 湖南师范大学自然科学学报, 1994, 17(1): 75-79.
- Liu S J, Liu Y. The estradiol induction of sex reversal in *Clarias Lazera* and the gonad observation[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universtis Normalis Hunanensis*, 1994, 17(1): 75-79(in Chinese).
- [16] Lin S, Benfey T J, Martin-Robichaud D J. Hormonal sex reversal in Atlantic cod, *Gadus morhua*[J]. *Aquaculture*, 2012, 364-365: 192-197.
- [17] Park I S, Kim J H, Cho S H, *et al.* Sex differentiation and hormonal sex reversal in the bagrid catfish *Pseudobagrus fulvidraco* (Richardson)[J]. *Aquaculture*, 2004, 232(1-4): 183-193.
- [18] Hendry C I, Martin-Robichaud D J, Benfey T J. Hormonal sex reversal of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.)[J]. *Aquaculture*, 2003, 219(1-4): 769-781.
- [19] Sfakianakis D G, Leris I, Mylonas C C, *et al.* Temperature during early life determines sex in zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton, 1822)[J]. *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, 2012, 17: 68-73.
- [20] Sandra G E, Norma M M. Sexual determination and differentiation in teleost fish[J]. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 2010, 20(1): 101-121.
- [21] Liu C K. Rudimentary hermaphroditism in the symbranchoid eel, *Monopterus javanensis*[J]. *Sinensia*, 1944, 15: 1-8.
- [22] Shapiro D Y. Plasticity of gonadal development and protandry in fishes[J]. *Journal of Experimental Zoology*, 1992, 261(2): 194-203.
- [23] Atz J W. Intersexuality in fishes[M]//Armstrong C N, Marshall A J. *Intersexuality in Vertebrates Including Man*. London: Academic Press, 1964: 145-232.
- [24] Vine E, Shears J, van Aerle R, *et al.* Endocrine (sexual) disruption is not a prominent feature in the pike (*Esox lucius*), a top predator, living in English waters[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2005, 24(6): 1436-1443.
- [25] Takahashi H, Shimizu M. Juvenile intersexuality in a cyprinid fish, the Sumatra barb, *Barbus tetrazona tetrazona*[J]. *Bulletin of the Faculty of Fisheries Hokkaido University*, 1983, 34(2): 69-78.
- [26] Longenecker K, Langston R, Crane M. Hermaphroditism in the dash-and-dot goatfish *Parupeneus barberinus*[J]. *Journal of Fish Biology*, 2017, 90(3): 1149-1152.
- [27] Agúndez P, Domínguez J, Pena J C. Sobre la fecundidad del lucio (*Esox lucius*) en la cuenca del Esla[J]. *Tierras de León: Revista de la Diputación Provincial*, 1987, 27(66): 119-127.
- [28] Domínguez J, Pena J C, González G. First occurrence of hermaphrodite pike, *Esox lucius* L., in the Esla basin (Spain)[J]. *Journal of Fish Biology*, 1989, 34(6): 973-975.
- [29] Coad B W. Review of the pikes of Iran (Family Esocidae) [J]. *Iranian Journal of Ichthyology*, 2016, 3(3): 161-180.
- [30] 王炬光. 乌伦古湖白斑狗鱼年龄、生长和繁殖生物学研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2011: 40-49.
- Wang J G. A study on age, growth and reproduction of northern pike (*Esox lucius* L., 1758) in Ulungur lake[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2011: 40-49 (in Chinese).

Feminization induction and hermaphroditism of northern pike (*Esox lucius*)

ZHANG Junjie*, HU Qiong, GUAN Xiaomeng, LI Fei, WANG Mingkun, LI Shengzhong

(College of Animal Science, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

Abstract: Northern pike (*Esox lucius*) is a very popular edible fish with high quality and an economically important fish. In China, northern pike is only distributed in the Ertixche River in northern Xinjiang. Northern pike females grow faster than males. To investigate and develop the feminization induction method on northern pike, 750 fries of this fish were divided into five groups in this study. Among them, four groups were used as experimental groups, and fed with *Tubifex hattai*, which had been soaked with 20 mg/L 17 β -estradiol, starting from different developmental time (10 d, 20 d, 30 d and 40 d, respectively after hatching). The other one group was used as control group, and fed with normal *T. hattai*. All fish in experimental groups were fed with 17 β -estradiol for 30 d, and then all the fish in the experimental groups and the control group were fed normally. On 206 d, survival situations of the fish in all groups were counted, and then all the fish were dissected, gonads were removed to perform histological observation. The results showed that feeding with *T. hattai*, which had been soaked with 20 mg/L 17 β -estradiol, had very obvious lethal effect on northern pike fries, and made the survival rate decreased from 43.5% in the control group to 14.3% \pm 8.3%. Higher ratios of female to male were obtained in 30 d treated group and 40 d treated group, especially the highest ratio, which reached 15 : 7, was obtained in the 30 d treated group, so it can be concluded that the key time point of gonad differentiation of northern pike may be in the period of 30–40 d after hatching. There were high proportions of hermaphroditism in both experimental and control groups, that is, a large number of primary oocytes (phase II) and spermatocytes appeared simultaneously in the same gland, and moreover, these oocytes showed marked degeneration. It is presumed that there was a protogynous juvenile hermaphroditism in the process of sexual differentiation of northern pike. This study will provide certain basis for production of all female northern pike fries using hormone induction techniques and further research on sex determining mechanism of northern pike.

Key words: *Esox lucius*; 17 β -estradiol; feminization induction; hermaphroditism

Corresponding author: ZHANG Junjie. E-mail: zhangjuji@sina.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31660739); Key Project of Scientific Research Program of the Higher Education Institution of Xinjiang (XJEDU2016I021); Undergraduate Innovation Project of Xinjiang Agricultural University (201610758124)