



基于天然 XY 雌鱼培育 YY 超雄尼罗罗非鱼的新方法

江东能¹, 彭友幸¹, 黄远青¹, 邝紫颖¹, 杨空松²,
MUSTAPHA Umar Farouk¹, 石红娟^{1*}, 李广丽^{1*}

(1. 广东海洋大学水产学院, 广东省名特优鱼类生殖调控与繁育工程技术研究中心, 广东 湛江 524088;

2. 广东海大集团股份有限公司畜牧水产研究中心, 海大中央研究院, 广东 广州 511400)

摘要: 前期报道了养殖群体存在天然 XY 雌鱼, 但其能否用于培育 YY 超雄罗非鱼尚不清楚。本研究首先引入遗传性别受 LG23 染色体严格控制的 CQ(重庆) 尼罗罗非鱼群体和具有天然 XY 雌鱼的 WC(湛江吴川) 群体, 将 CQ 群体 XY 雄鱼与 WC XY 雌鱼杂交, 检验杂交 F₁ YY 超雄鱼是否可用于控制后代性别, 并比较杂交 F₁ XY 和 YY 罗非鱼体质量、性腺指数、血清激素水平和性腺基因表达情况。研究发现, CQ XY 雄鱼和 WC XY 雌鱼交配, 获得的 F₁ 中有 25% 为 YY 超雄鱼, 经鉴定为全雄且可育。将 F₁ YY 超雄鱼与 WC XX 雌鱼、WC XY 雌鱼(母本)、杂交 F₁ XX 雌鱼和 CQ XX 雌鱼交配, 后代几乎全雄, 仅在与 F₁ XX 雌鱼交配的后代中有 2 尾雌鱼(雄性率 98%)。在孵化后 180 d, 杂交 F₁ 中 XY 和 YY 个体的体质量、性腺指数、血清激素水平差异不显著。基因表达分析发现, YY 鱼精巢中 *AmhX/AmhY* mRNA 表达显著高于 XY 鱼, 而 *Dmrt1* 和 *Cyp11b2* mRNA 表达水平差异不显著。杂交 F₁ YY 和 XY 鱼生理指标无明显差异。因此, 采用尼罗罗非鱼天然 XY 雌鱼能够培育 YY 超雄鱼, 且该 YY 超雄鱼能够用于罗非鱼性别控制。

关键词: 尼罗罗非鱼; YY 超雄鱼; 性别控制; 基因表达

中图分类号: Q 786; S 965.125

文献标志码: A

尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 属于丽鱼科 (Cichlidae), 具有适应性强、繁殖力高、食性广、抗病力强和肉质鲜美等特点, 已成为世界性的主要养殖鱼类。目前尼罗罗非鱼已是我国重要的养殖鱼类, 也是我国重要的出口创汇水产品之一, 特别是在广东、广西、海南、福建等地, 尼罗罗非鱼养殖、加工和贸易产业发达。近年来, 世界罗非鱼养殖产量大幅增加。2000 年产量为 97 万 t, 而到 2016 年增长到约 420 万 t^[1]。

雄性罗非鱼比雌鱼生长快。此外, 雌性尼罗罗非鱼 130 d 即达到性成熟, 在养殖期间能多次繁殖, 严重限制了雌鱼生长, 导致池塘中产

生大量不同批次的罗非鱼竞争溶解氧、营养物质和空间, 且池塘新繁殖的罗非鱼幼鱼在年终又不能长成商品规格。雌雄混合养殖大大影响了罗非鱼养殖的产量和效益, 因此, 商业性大规模生产全雄鱼是国内外尼罗罗非鱼繁殖的目标^[2-3]。

生产全雄鱼可以通过手工挑选、激素诱导和种间杂交等方式, 但都有局限性, 如手工挑选工作量大, 准确性差; 激素诱导存在食品和生态安全性问题; 种间杂交对于亲本纯度要求高, 雄性率一般为 90%~95%, 仍有相当数量的雌鱼^[4-5]。控制罗非鱼性别的三系配套技术, 也称为遗传雄性罗非鱼技术 (genetically male tilapia,

收稿日期: 2019-11-30 修回日期: 2020-01-04

资助项目: 国家自然科学基金(31702326); 广东海洋大学科研启动经费

通信作者: 石红娟, E-mail: shihj@gdou.edu.cn; 李广丽, E-mail: ligl@gdou.edu.cn

GMT), 是一种先进的罗非鱼全雄鱼苗生产技术, 其平均雄性率大于 98%^[3-4, 6-7]。GMT 技术大量生产的关键是建立快速有效地区分正常雄鱼 (XY♂) 和超雄鱼 (YY♂) 以及正常雌鱼 (XX♀) 和雌性转化鱼 (XY♀) 的方法。各种基因型的罗非鱼在外形上没有差异, 传统方法需要测交验证基因型。近年来, 研究人员开发了尼罗罗非鱼性别特异性 DNA 分子标记, 建立了分子标记辅助选育 (marker-assisted selection, MAS) 技术, 能快速鉴定罗非鱼遗传性别, MAS 使得 GMT 的商业化生产成为可能^[4, 7]。MAS-GMT 技术的第一步需诱导 XY 个体性别逆转, 即培育 XY 转化雌鱼 (XY♀), 仍然需使用雌激素, 不能完全避免污染, 费时费力。研究中国各地来源的 8 个尼罗罗非鱼群体 (HN、THS 来自广东佛山市南海科达恒生水产有限公司; HN1、HN2 来自海南大学; NG 为新吉富罗非鱼 (*O. niloticus*, GIFT); T1、T2 和 TH 来自广东佛山南海百容水产良种有限公司), 发现除 HN 群体外都具有天然的 XY 雌鱼^[4]。罗非鱼天然性逆转可能受环境因素的影响, 例如高温处理可提高罗非鱼雄性率^[8-9]。本研究从尼罗罗非鱼群体中鉴定天然的 XY♀, 将其与遗传性别稳定群体的 XY♂ 交配, 杂交 F₁ 获得了 YY 超雄鱼, 对子代 YY 超雄罗非鱼进行测交验证。并对比分析了 XY 和 YY 超雄罗非鱼生长、性腺指数、血清激素水平和基因表达情况。本研究证明天然 XY♀ 可用于 YY 超雄生产, 简化了 MAS-GMT 技术操作流程, 对水产养殖中的罗非鱼性别控制具有指导意义。

1 材料与方法

1.1 实验对象

实验采用的 2 个尼罗罗非鱼群体分别引自重庆西南大学淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室 (CQ 群体) 和广东湛江国联集团吴川罗非鱼苗场基地 (WC 群体)。CQ 群体最初是由日本国立基础生物研究所从非洲埃及引种; WC 群体来自吉富品系。实验鱼在室内循环水系统养殖, 一套系统具有 3 个能容纳 120 L 水的养殖鱼缸, 另具 1 个能容纳 60 L 水的玻璃缸用于放置过滤材料, 水温控制在 26~28 °C, 日光灯光照 12 h (8:00 AM—8:00 PM), 日投喂 2 次商品配合饲料, 每天投喂前吸走粪便, 日换水 10%, 增

氧机 24 h 充气。实验亲鱼都采用 Biomark PIT (Passive Integrated Transponders) 标记, 一套养殖系统养殖亲鱼密度控制在 6 尾 (体质量 300~600 g/尾), 同一玻璃缸中两尾亲鱼需隔离, 防止打斗致死。亲鱼的表型性别通过生殖孔形态确认, 开展如下人工繁殖实验: ① WC 群体 XX/XY♀ 与 CQ 群体 XY♂ 交配, 获得杂交 F₁; ② 杂交 F₁ YY 超雄罗非鱼分别与 CQ 和 WC 群体雌鱼交配, 包括与其母本回交获得 BC₁; ③ 杂交 F₁ YY 超雄鱼与 F₁ XX♀ 交配, 获得杂交 F₂。采用人工授精方式进行繁殖, 受精卵在人工孵化系统中孵化, 水温控制在 26~28 °C。鱼苗开口后在室内循环水系统中养殖, 开口饵料为人工配合饲料 (S1, 山东升索渔用饲料研究中心, 中国)。所有繁殖后代在 90 dah (days after hatching, 孵化后天数) 时取样, 麻醉后解剖取性腺, 波恩氏液固定, 组织切片, H.E 染色, 显微观察确定表型性别。杂交 F₁ XY 和 YY 个体在 180 dah 时取样, 麻醉后解剖取性腺组织, 称量体质量和性腺重, 计算性腺指数 (gonadal somatic index, GSI), 部分性腺用于 RNA 提取, 液氮速冻后 -80 °C 保存, 部分性腺用波恩氏液固定, 用于组织学观察。

1.2 遗传性别鉴定

基因组采用试剂盒 (N1173, 东盛, 中国) 提取, 采用 Sun 等^[4] 开发的尼罗罗非鱼性别特异分子标记 (Marker-5) 鉴定实验鱼遗传性别 (表 1)。PCR 反应程序: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 共 37 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物用 15 mg/mL 琼脂糖凝胶电泳检测, X 和 Y 染色体特异的条带大小分别约为 1 422 和 982 bp。

1.3 血清激素水平测定

取 180 dah 杂交 F₁ XY 和 YY 鱼尾静脉血, 4 °C 过夜保存, 4 °C 5 000 r/min 离心 5 min, 收集血清, -40 °C 保存备测。血清睾酮 (testosterone, T)、雌二醇 (17β-estradiol, E₂) 和 11-酮基睾酮 (11-keto-testosterone, 11-KT) 水平采用 Cayman 试剂盒测定, 按试剂盒说明书进行测定。

1.4 实时荧光定量 PCR (qPCR) 检测

采用 Trizol 试剂盒 (Invitrogen, 15596018, 美国) 提取 180 dah 杂交 F₁ XY 和 YY 个体性腺组织中性腺总 RNA。用 10 mg/mL 的琼脂糖凝胶电

表 1 本研究所用引物

Tab. 1 Primers used in the present study

基因 gene	引物基因 primer	序列基因 sequence	用途基因 function
<i>AmhX/AmhY</i>	Marker5-F	5'ATGGCTCCGAGACCTTGACTG3'	遗传性别鉴定
	Marker5-R	5'CAGAAATGTAGACGCCAGGTAT3'	
<i>AmhX/AmhY</i>	<i>AmhX/AmhY</i> -F	5'TCAGACAGAGACTGGACCAGACTT3'	荧光定量
	<i>AmhX/AmhY</i> -R	5'TGAGAGCCTTCAGCCCACAGA3'	
<i>Dmrt1</i>	<i>Dmrt1</i> -F	5'CGGCCAGGTTGCTCTGAG3'	荧光定量
	<i>Dmrt1</i> -R	5'CCAATTCATTCTTGACCATCA3'	
<i>Cyp11b2</i>	<i>Cyp11b2</i> -F	5'CAAAGAAGTCTCAGTTGTACCA3'	荧光定量
	<i>Cyp11b2</i> -R	5'CTCAGATATGACAGAAGTGGGC3'	
<i>β-actin</i>	<i>β-actin</i> -F	5'GGCATCACACCTTCTACAACGA3'	内参
	<i>β-actin</i> -R	5'ACGCTCTGTGAGGATCTTCA3'	

泳检测 RNA, 并用 Nanodrop 2000 超微量核酸蛋白测定仪 (Thermo Scientific, 美国) 检测浓度和质量。所有 RNA 样品各取 1 μ g, 按照 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 试剂盒 (TaKaRa, RR047A, 日本) 说明书合成 cDNA。采用 Roche light Cycler™ 96 实时荧光定量 PCR 仪 (Roche, 瑞士) 进行 qPCR 检测 *AmhX/AmhY* (*AmhX* 和 *AmhY* 序列差异小, 很难设计差异扩增引物, 本实验引物能同时扩增它们^[10])、*Dmrt1* 和 *Cyp11b2* 在 XY 和 YY 个体性腺中的表达, 以 *β -actin* 为内参基因, 引物见表 1。qPCR 参照 SYBR® Green Real Time PCR Master Mix (TOYOBO, QPK-201, 日本) 试剂盒说明书进行, 反应体系: SYBR® Green Real Time PCR Master Mix 10 μ L, 上下游引物各 0.8 μ L (10 μ mol/L), cDNA 2 μ L, 水补齐至 20 μ L。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s (收集荧光信号), 共 40 个循环。运用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 方法计算基因相对表达量。每组 3 个生物学重复。

1.5 数据分析

数据采用平均值 \pm 标准差表示, 统计分析采用 SPSS 17.0 (美国) 软件进行。组间差异采用独立样本 *t* 检验, 显著性水平设置为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 筛选尼罗罗非鱼天然 XY 雌鱼

本实验室引入的 CQ 群体性别严格受到遗传

性别决定, Marker-5 标记鉴定的遗传性别与 H.E 染色鉴定表型性别结果完全吻合。而引入的 WC 群体, 6 尾雌鱼中有 2 尾 XY 雌鱼, 由于该 XY 雌鱼并不是经性类固醇激素处理获得, 如雌二醇诱导, 是养殖群体中天然性逆转 XY 雌鱼, 所以称之为天然 XY 雌鱼 (图 1)。

2.2 采用 WC 群体 XY \square 与 CQ 群体 XY δ 杂交培育 YY 超雄鱼

本研究一共构建了 6 个家系, 除家系 5 外, 其他家系获得的鱼苗数均大于 500 尾。由于实验鱼缸养殖空间限制, 各家系留取 100 尾左右用于 90 dah 时遗传性别和表型性别鉴定 (表 2)。WC 群体 XY \square 能正常产卵, 将其与 CQ 群体 XY δ 杂交获得 F₁ (家系 1)。经鉴定 F₁ 有 3 种基因型, 分别为 XX ($n=12$)、XY ($n=28$) 和 YY ($n=13$), 符合 1:2:1 分离比, 即符合孟德尔遗传定律。CQ XY δ 与 WC XX \square 交配 (家系 2), 后代具有 XX 和 XY 型, XX 个体几乎全部为雌鱼, 仅 3 尾 XX 雄鱼, 而 XY 后代全为雄鱼。将 F₁ YY 雄鱼与 WC XY \square (母本)、WC XX \square 、CQ XX \square 雌鱼交配, 获得全雄后代 (家系 3、家系 5 和家系 6)。杂交 F₁ YY δ 与 F₁ XX \square 交配获得 F₂ (家系 4), F₂ 几乎全雄, 仅有 2 尾 XY 雌鱼, 雄性率 98% (图 2, 表 2, 图版)。

2.3 杂交 F₁ XY 和 YY 雄鱼比较

在孵化后 180 dah, 组织学观察显示杂交 F₁ 的 XY 和 YY 个体性腺都发育为精巢 (图版)。杂

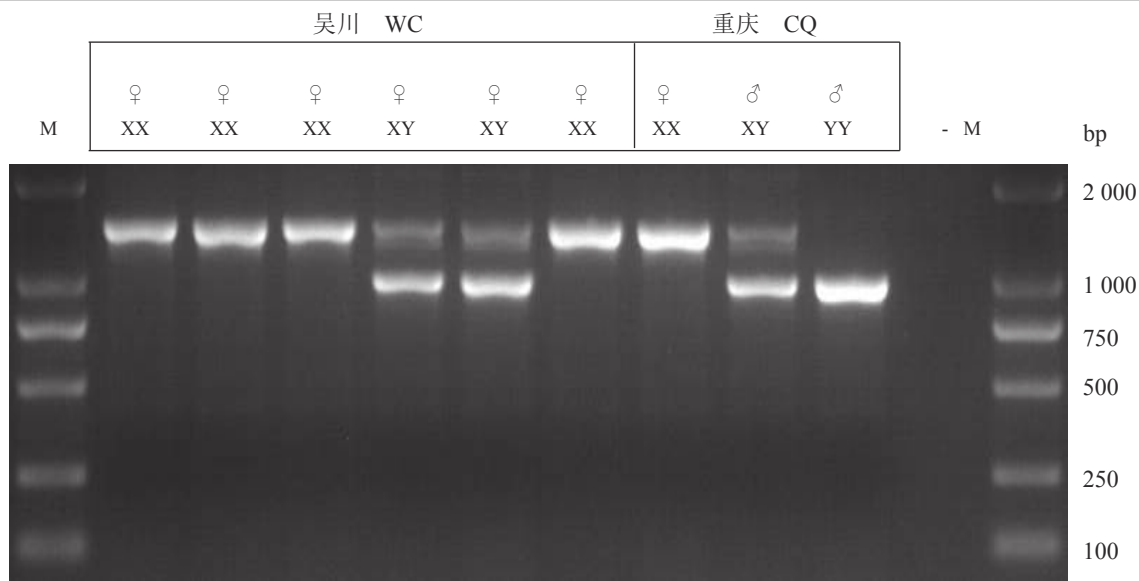


图 1 分子标记鉴定吴川群体实验鱼遗传性别

对照 XX、XY 和 YY 为通过测交验证遗传性别的重庆群体尼罗罗非鱼。M. DNA 分子量标准。-. 水

Fig. 1 Genotypic sex of the experimental fish from Wuchuan (WC) by a sex-linked marker

Controls of XX, XY and YY are genetic XY, XX and YY *O. niloticus* from CQ population confirmed by progeny test. M. DNA molecular weight marker. -. water

表 2 子代性别比例及性别连锁分子标记鉴定遗传性别

Tab. 2 Sex ratio and genotypic sex of progenies from different reproductive combinations by a sex-linked marker

雌雄亲本 crossings of female & male breeders	家系 families	鉴定表型性别数目 N sexed	雄性率/% male ratio	表型 phenotype	遗传性别 genotype	检测数目 tested number
吴川 F ₀ -1(XY)×重庆 F ₀ -1(XY)*	1	35	74.3	♀	XX	9
					XY	0
					YY	0
				♂	XX	0
					XY	15
					YY	11
吴川 F ₀ -2(XX)×重庆 F ₀ -2(XY)	2	46	63.0	♀	XX	17
					XY	0
				♂	XX	3
					XY	26
吴川 F ₀ -1(XY)×杂交 F ₁ -1(YY)	3	48	100	♀	XY	0
					YY	0
				♂	XY	24
					YY	24
杂交 F ₁ -2(XX)×杂交 F ₁ -1(YY)	4	99	98.0	♀	XY	2
				♂	XY	13**
吴川 F ₀ -2(XX)×杂交 F ₁ -3(YY)	5	16	100	♀	XY	0
				♂	XY	16
重庆 F ₀ -3(XX)×杂交 F ₁ -1(YY)	6	76	100	♀	XY	0
				♂	XY	13**

注: *F_n-m, 其中n表示代数; m. 鱼号码; **仅检测了部分雄鱼的分子遗传性别

Notes: *. F_n-m, n and m indicate generation and fish number, respectively; **. part of the XY male fish were tested by a sex-linked marker

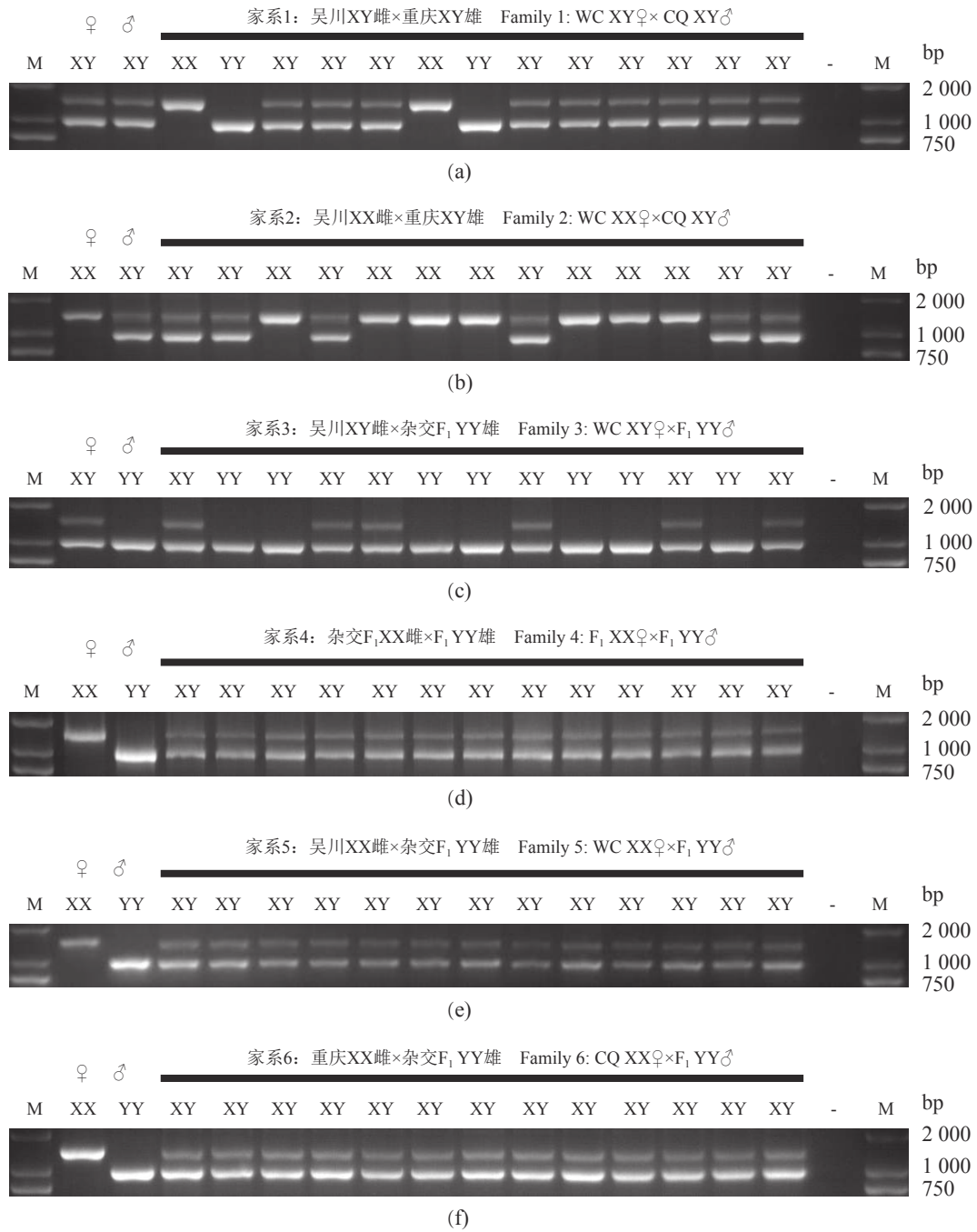


图2 分子标记检测不同繁殖组合的亲代和子代的基因型

Fig. 2 Genotypic sex of the paternal and progeny from different reproductive combinations by a sex-linked marker

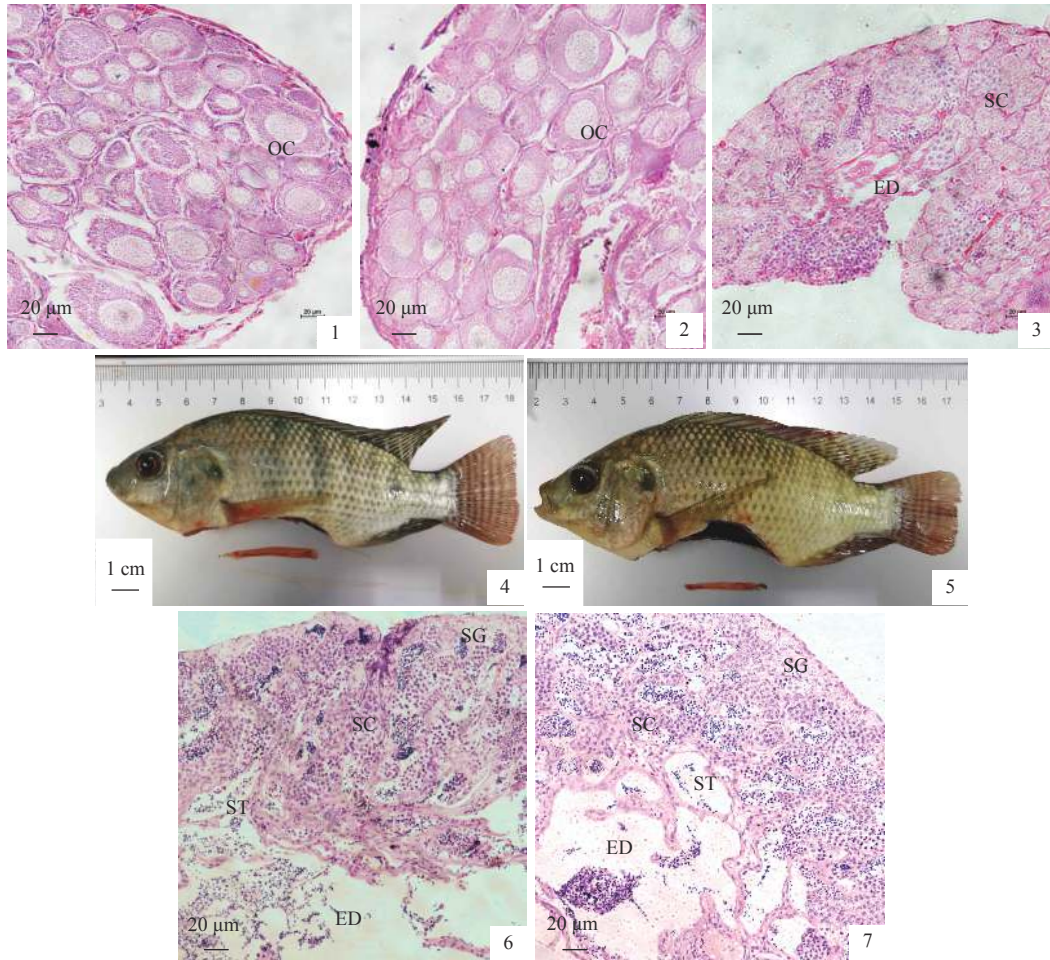
交 F₁ 的 XY 和 YY 个体的体质量和 GSI 差异不显著 (图 3)。血清激素水平分析发现 F₁ 的 XY 和 YY 个体血清中 T、E₂ 和 11-KT 水平差异均不显著 (图 4)。基因表达分析发现, F₁ 的 YY 个体精巢 *AmhX/AmhY* 的表达显著高于 XY 个体, 而 *Dmrt1* 和 *Cyp11b2* 的表达在 XY 和 YY 个体之间差异不显著 (图 5)。

<https://www.china-fishery.cn>

3 讨论

本研究采用天然 XY 雌鱼培育出 YY 超雄尼罗罗非鱼, 培育的 YY 超雄鱼能够与多种基因型雌鱼交配产生全雄后代 (雄性率 >98%), 首次证明了天然 XY 雌鱼能够用于 YY 超雄鱼的培育, 可为水产养殖中罗非鱼的性别控制提供参考。

中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries



图版 尼罗罗非鱼性腺结构和组织切片

1-2. 孵化后 90 d F₁ XY 雌鱼卵巢切片 H.E 染色图片; 3. 孵化后 90 d F₁ XY 雄鱼精巢切片 H.E 染色图片; 4-5. 孵化后 180 d F₁ XY 和 YY 雄鱼性腺外观图; 6-7. 孵化后 180 d F₁ XY 和 YY 雄鱼精巢 H.E 染色图片。OC. 卵母细胞; SC. 精母细胞; ED. 输出精管; SG. 精原细胞; ST. 精细胞

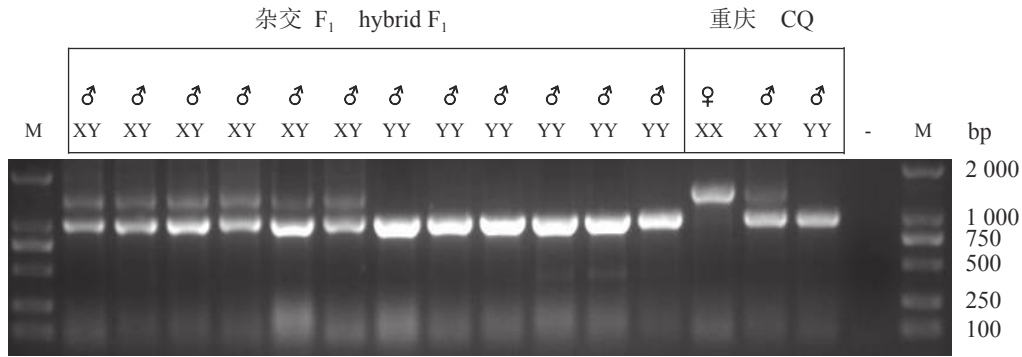
Plate Phenotype and histology of gonad of *O. niloticus*

1-2. H.E staining of the F₁ XY female ovary at 90 days after hatching (dah); 3. H.E staining of the F₁ XY male testis at 90 dah; 4-5. gonad structure of the F₁ XY and YY male testes at 180 dah; 6-7. H.E staining of the F₁ XY and YY male testes at 180 dah. OC. oocyte; SC. spermatocyte; ED. efferent duct; SG. spermatogonium; ST. spermatid

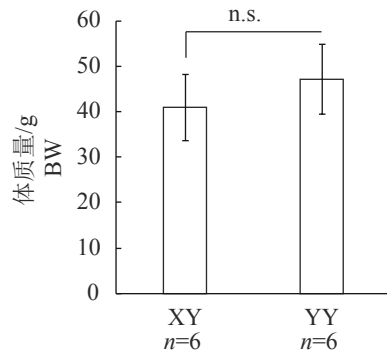
本研究还对比了 XY 和 YY 鱼的生长、血清激素水平和性腺基因表达等生理指标, 发现 XY 和 YY 鱼很多生理参数基本一致。

20 世纪 80 年代人们提出 GMT 罗非鱼性别控制技术, 目前, 利用该技术培育 YY 鱼, 仍需先使用雌激素诱导获取 XY 转化雌鱼^[6]。用 17 α -乙炔雌二醇 (17 α -ethynylestradiol) 浸泡尼罗罗非鱼胚胎 4 h 即可高效诱导 XY 鱼性别逆转, 激素使用量虽然较少, 但不能实现完全禁用激素, 同时还需诱导处理个体生长至性成熟才能用于繁殖建系, 仍然费时^[11]。本研究采用的性别连锁标记 Marker-5 位于 LG23 染色体上, 该 Y 染色体上

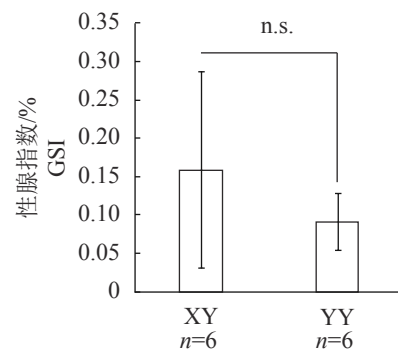
AmhY 是克隆的第一个尼罗罗非鱼性别决定基因^[10]。*AmhY* 具有很强的雄性性别控制能力, CQ 群体具有 *AmhY* 的 YY 雄鱼与 XX 雌鱼交配, 在实验室条件下没有发现 XY 雌鱼, 在养殖场生产小试, XY 后代雄性率也高达 98.2%^[4]。而在海南一尼罗罗非鱼群体 (HN1) 中, Marker-5 鉴定的 XY 个体雄性率却低至 68.4%, 不同群体天然 XY 雌鱼产生的原因可能不同^[4]。在本研究中 F₀ 和 F₂ 群体都具有天然 XY 雌鱼, 由于 F₀ 和 F₂ 亲缘关系较近, 它们中 XY 天然雌鱼产生的原因可能相同。本研究中 XY 雌鱼的形成可能是由于其他雌性性别决定位点的作用, 这些雌性性别决



(a)



(b)



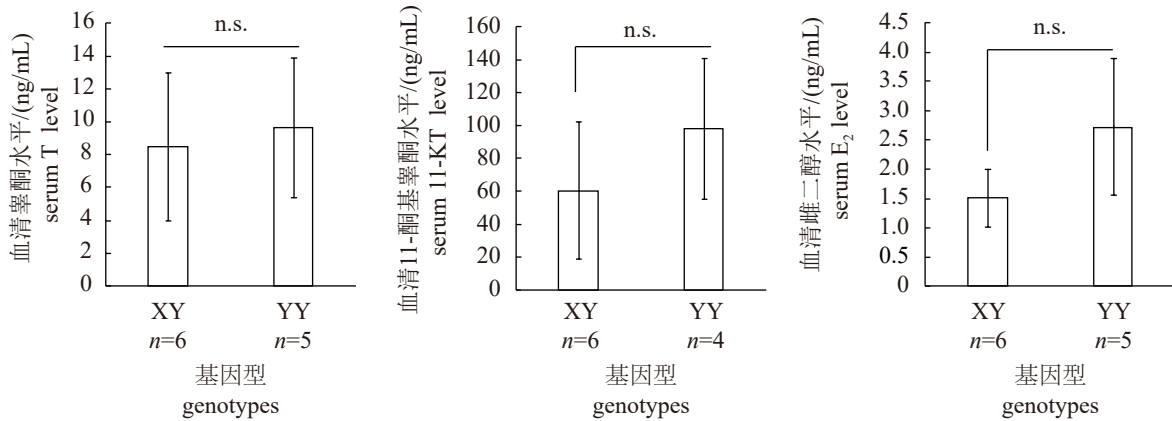
(c)

图 3 杂交 F₁ XY 和 YY 个体遗传性别鉴定、体质量和性腺指数

对照 XX、XY 和 YY 为通过测交验证遗传性别的重庆群体尼罗罗非鱼；n.s. 差异不显著， $P>0.05$ ，下同

Fig. 3 Genotypic sex, body weight and GSI of XY and YY F₁ hybrids

Controls of XX, XY and YY are genetic XY, XX and YY *O. niloticus* from CQ population confirmed by progeny test; n.s.. not significant, $P>0.05$, the same below



(a)

(b)

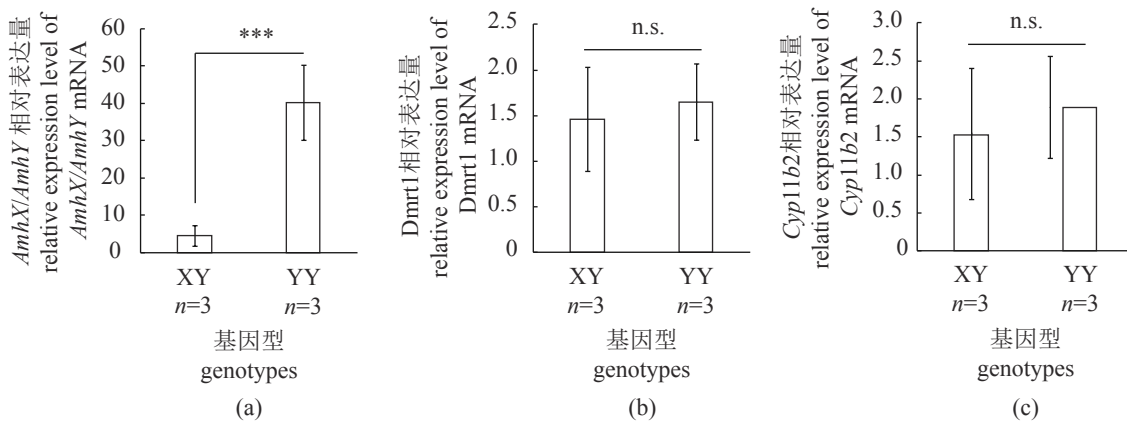
(c)

图 4 杂交 F₁ XY 和 YY 个体血清激素水平

Fig. 4 Serum steroid hormone levels of XY and YY F₁ hybrids

定位点可能来自不同尼罗罗非鱼群体，也可能来自其他种罗非鱼。国内水产相关高校、研究所或企业有从国外引入多种罗非鱼的历史，罗

非鱼种间杂交容易实现，国内养殖的尼罗罗非鱼可能杂交渐渗了其他罗非鱼的基因。国内研究人员将具有 ZZ-ZW 性别决定系统的奥利亚罗

图 5 杂交 F₁ XY 和 YY 个体性腺基因表达Fig. 5 Expression profiles of genes in gonads of XY and YY F₁ hybrids

***. $P < 0.001$

非鱼 (*O. aureus*) 和 XX-XY 系统的尼罗罗非鱼杂交, 发现 WY 个体为雌鱼, 认为 W 染色体上位于 Y 染色体^[12]。国内外其他研究团队却证明奥利亚罗非鱼和尼罗罗非鱼 WY 型杂交后代为雄性, 即 Y 染色体上位于 W 染色体^[13-15]。有的尼罗罗非鱼群体雄性性别与 LG1 连锁, 为其 Y 染色体, 由于 LG1 存在倒转, 目前尚无法克隆 LG1 上的雄性性别决定基因^[16-17]。杂交 WY 型雌鱼的 Y 染色体可能是来源于尼罗罗非鱼 LG1, 而非含 *AmhY* 的 LG23^[14]。虽然种间杂交已证明 LG23 的 *AmhY* 显性上位于奥利亚罗非鱼 W 染色体 (LG3) 上的雌性性别决定位点, 但目前尚不清楚 LG3 上的雌性性别决定位点纯合后能否隐性上位于 *AmhY*, 杂交渐渗仍可能是导致天然 XY 雌鱼产生的原因^[14]。最近, 西南大学将奥利亚罗非鱼的 LG3 性别决定区间收窄至 3.6 Mb, 但尚未鉴定其性别决定基因^[18]。克隆鉴定不同种罗非鱼性别决定基因将有助于认识天然 XY 雌鱼形成机制, 有助于罗非鱼性别控制。

最近, 通过基因编辑技术, 敲除尼罗罗非鱼性别决定分化相关基因 *Amhr2* 和 *Gsdf* 都导致 XY 个体由雌向雄性别逆转^[10, 14]。然而尼罗罗非鱼 *Amhr2* 纯合敲除后卵巢发育异常, 且不育^[19]。最近, 发现青鳉 (*Oryzias latipes*) 和斑马鱼 (*Danio rerio*) *Gsdf* 纯合突变雌鱼分别表现为育性低下和逐渐不育^[20-21]。同样, 在尼罗罗非鱼中也发现 *Gsdf* 纯合突变雌鱼育性受到影响。本研究发现天然 XY 雌鱼育性正常, 表明其不含有影响育性的基因突变。

研究表明含 *AmhY* 的天然 XY 雌鱼广泛存在于不同尼罗罗非鱼群体, 且 XY 雌鱼的比例在不同群体有差异, 这可能与它们的遗传背景有关^[4]。已有研究显示, 尼罗罗非鱼不同群体或品系的性别决定区域可能位于不同染色体上, 因此, 无法找到能够准确鉴别所有群体性别的分子标记。罗非鱼种间杂交结果表明, LG23 *AmhY* 的雄性性别决定能力较强, 生产实践中可优先采用 *AmhY* 连锁的分子标记用于罗非鱼性别控制育种。最近, 研究人员在尼罗罗非鱼野生群体中发现, 含 *AmhY* 却不含 *AmhΔy* 个体性别可为雌或雄, 表明性别决定区间序列的改变可改变 *AmhY* 的性别决定功能, 性别决定区域序列改变可能是由染色体重组引起^[22]。在青鳉中, 性别决定基因 *Dmy* 的突变也会导致 XY 个体由雌向雄的性别逆转^[23]。因此, 要保证 *AmhY* 连锁的分子标记能够准确鉴定性别, 首先需要保证该群体 *AmhY* 基因及其附近区域不存在能导致 *AmhY* 雄性性别决定能力失去或降低的序列变异。本研究培育的 YY 超雄鱼与 XX 个体交配, 后代 XY 雄性率高达 98%, 表明来自天然 XY 雌鱼的 *AmhY* 基因仍具有正常的雄性性别决定能力, 天然 XY 雌鱼形成的机制还有待进一步研究。本研究提示采用 YY 超雄罗非鱼控制性别时需要考虑亲鱼的遗传背景, 本研究开发的 YY 超雄罗非鱼能否用于控制其他群体的性别还有待进一步研究。

17 α -乙炔雌二醇短暂处理尼罗罗非鱼胚胎能将 XY 个体逆转为雌鱼, 但不能逆转 YY 个体性别, YY 个体由于 Y 染色体上基因剂量效应使其

不容易逆转^[11]。本研究也发现 YY 个体的 *AmhX/AmhY* 表达量显著高于 XY 个体, 这可能是 YY 个体性别不易被雌激素逆转的原因。外源雌激素可能通过诱导内源雌激素的合成, 内源雌激素进而诱导 XY 雄鱼性别逆转^[24]。对小鼠的研究中发现, Amh 蛋白具有拮抗雌激素合成的功能^[25]。可能更高剂量、更长时间的雌激素处理才能诱导 YY 个体转化为雌鱼。然而, 高剂量和长时间的雌激素诱导处理可能会对性腺发育造成不可逆的影响。因此, 诱导的罗非鱼 YY 雌鱼的繁殖力很低, 甚至不育, 可能是由于雌激素处理时间过长或剂量过高导致^[14]。在 YY 超雄黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*) 培育中, YY 雌鱼可育, YY♀和 YY♂交配可以大规模培育 YY 超雄鱼, 省去了分子标记筛选 YY 鱼的繁琐操作^[26]。因此, 培育可育 YY♀是尼罗罗非鱼性别控制的首要问题, 下一步还可探索是否存在天然可育 YY♀。培育尼罗罗非鱼 YY♀鱼仍然需要先获得 XY♀鱼作为母本培育 YY 个体, 所以本研究利用天然 XY 雌鱼生产 YY 鱼的新方法具有生产价值。

综上, 本研究采用天然 XY 雌鱼作为亲本培育的 YY 超雄鱼能够控制罗非鱼的性别, 是一种新的 YY 超雄罗非鱼快速培育路线。该路线培育的 YY 超雄罗非鱼能够正常繁殖, 可用于罗非鱼性别控制。

感谢西南大学王德寿教授和国联水产提供实验用鱼。

参考文献 (References):

- [1] FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Cultured aquatic species information programme, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) [EB/OL]. (2016). http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis_niloticus/en.
- [2] 刘筠, 刘国安, 陈淑群, 等. 尼罗罗非鱼性腺发育的研究[J]. 水生生物学集刊, 1983, 8(1): 17-32.
Liu Y, Liu G, Chen S Q, *et al.* Studies on the gonadal development of *Tilapia nilotica*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1983, 8(1): 17-32(in Chinese).
- [3] Mair G C, Abucay J S, Beardmore J A, *et al.* Growth performance trials of Genetically Male Tilapia (GMT) derived from YY-males in *Oreochromis niloticus* L.: on station comparisons with mixed sex and sex reversed male populations[J]. *Aquaculture*, 1995, 137(1-4): 313-322.
- [4] Sun Y L, Jiang D N, Zeng S, *et al.* Screening and characterization of sex-linked DNA markers and marker-assisted selection in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Aquaculture*, 2014, 433: 19-27.
- [5] Lozano C A, Gjerde B, Ødegård J, *et al.* Heritability estimates for male proportion in hybrids between Nile tilapia females (*Oreochromis niloticus*) and blue tilapia males (*Oreochromis aureus*)[J]. *Aquaculture*, 2014, 430: 66-73.
- [6] 杨永铨, 张中英, 林克宏, 等. 应用三系配套途径产生遗传上全雄莫桑比克罗非鱼[J]. 遗传学报, 1980, 7(3): 241-246.
Yang Y Q, Zhang Z Y, Lin K H, *et al.* Use of three line combination for production genetic all-male *Tilapia mossabica*[J]. Acta Genetica Sinica, 1980, 7(3): 241-246(in Chinese).
- [7] Chen C H, Li B J, Gu X H, *et al.* Marker-assisted selection of YY supermales from a genetically improved farmed tilapia-derived strain[J]. *Zoological Research*, 2019, 40(2): 108-112.
- [8] Baroiller J F, D'Cotta H, Bezault E, *et al.* Tilapia sex determination: Where temperature and genetics meet[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2009, 53: 30-38.
- [9] Wang Y Y, Sun L X, Zhu J J, *et al.* Epigenetic control of *cyp19a1a* expression is critical for high temperature induced Nile tilapia masculinization[J]. *Journal of Thermal Biology*, 2017, 69: 76-84.
- [10] Li M H, Sun Y L, Zhao J E, *et al.* A tandem duplicate of anti-Mullerian hormone with a missense snp on the y chromosome is essential for male sex determination in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*[J]. *PLoS Genetics*, 2015, 11(11): e1005678.
- [11] Gennotte V, Mafwila K P, Ulysse B, *et al.* Brief exposure of embryos to steroids or aromatase inhibitor induces sex reversal in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Journal of Experimental Zoology-Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 2015, 323(1): 31-38.
- [12] 杨永铨, 张海明, 陈远生. WY♀-YY♂型罗非鱼繁殖体系研究[J]. *淡水渔业*, 2013, 43(1): 89-93.

- Yang Y Q, Zhang H M, Chen Y S. Research of propagation system of WY♀-YY♂ type tilapia[J]. *Freshwater Fisheries*, 2013, 43(1): 89-93(in Chinese).
- [13] Mair G C, Scott A G, Penman D J, *et al.* Sex determination in the genus *Oreochromis*. 1. Sex reversal, gynogenesis and triploidy in *O. niloticus* (L.)[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1991, 82(2): 144-152.
- [14] 江东能. Gsdf 和 Wt1 在罗非鱼性别分化和性腺发育中的功能研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2016.
Jiang D N. Roles of Gsdf and Wt1 in sex differentiation and gonadal development in tilapia[D]. Chongqing: Southwest University, 2016 (in Chinese).
- [15] 万松良, 筵金华, 任炳琛, 等. 奥利亚罗非鱼(WZ♀)×尼罗罗非鱼(XY♂、YY♂)杂交子代的性比分析[J]. *水产学杂志*, 2018, 31(3): 14-19.
Wang S L, Ce J H, Ren B C, *et al.* Sex ratio analysis of hybrid F1 from female blue tilapia *Oreochromis aureus* (WZ ♀)× male Nile tilapia *O. niloticus* (XY ♂, YY ♂) crosses[J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2018, 31(3): 14-19(in Chinese).
- [16] Palaiokostas C, Bekaert M, Khan M G Q, *et al.* Mapping and validation of the major sex-determining region in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) Using RAD sequencing[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e68389.
- [17] Gammerding W J, Conte M A, Acquah E A, *et al.* Structure and decay of a proto-Y region in Tilapia, *Oreochromis niloticus*[J]. *BMC Genomics*, 2014, 15: 975.
- [18] 樊征. 奥利亚罗非鱼性别连锁分子标记的筛选 [D]. 重庆: 西南大学, 2018.
Fan Z. Identification and validation of sex-linked markers in blue tilapia (*Oreochromis aureus*)[D]. Chongqing: Southwest University, 2018 (in Chinese).
- [19] Liu X Y, Xiao H S, Jie M M, *et al.* Amh regulate female folliculogenesis and fertility in a dose-dependent manner through Amhr2 in Nile tilapia[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2020, 499: 110593.
- [20] Guan G J, Sun K Q, Zhang X, *et al.* Developmental tracing of oocyte development in gonadal soma-derived factor deficiency medaka (*Oryzias latipes*) using a transgenic approach[J]. *Mechanisms of Development*, 2017, 143: 53-61.
- [21] Yan Y L, Desvignes T, Bremiller R, *et al.* Gonadal soma controls ovarian follicle proliferation through Gsdf in zebrafish[J]. *Developmental Dynamics*, 2017, 246(11): 925-945.
- [22] Sissao R, D'Cotta H, Baroiller J F, *et al.* Mismatches between the genetic and phenotypic sex in the wild Kou population of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*[J]. *PeerJ*, 2019, 7: e7709.
- [23] Matsuda M, Sakaizumi M. Evolution of the sex-determining gene in the teleostean genus *Oryzias*[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2016, 239: 80-88.
- [24] Shi H J, Gao T, Liu Z L, *et al.* Blockage of androgen and administration of estrogen induce transdifferentiation of testis into ovary[J]. *Journal of Endocrinology*, 2017, 233(1): 65-80.
- [25] Vigier B, Forest M G, Eychenne B, *et al.* Anti-Mullerian hormone produces endocrine sex reversal of fetal ovaries[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989, 86(10): 3684-3688.
- [26] Liu H Q, Guan B, Xu J, *et al.* Genetic manipulation of sex ratio for the large-scale breeding of YY super-male and XY all-male yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco* (Richardson))[J]. *Marine Biotechnology*, 2013, 15(3): 321-328.

A new method to produce YY super-male Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by using naturally sex-reversed XY female

JIANG Dongneng¹, PENG Youxing¹, HUANG Yuanqing¹, KUANG Ziyang¹, YANG Kongsong²,
MUSTAPHA Umar Farouk¹, SHI Hongjuan^{1*}, LI Guangli^{1*}

(1. Guangdong Province Famous Fish Reproduction Regulation and
Breeding Engineering Technology Research Center of Engineering Technology Research Center,
Fisheries College of Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;

2. Haid Central Research Institute, Animal Husbandry and Fisheries Research Center of
Guangdong Haid Group Co., Ltd., Guangzhou 511400, China)

Abstract: Previously naturally sex-reversed XY females were found in several *Oreochromis niloticus* populations, while it is unclear whether the naturally sex-reversed XY females could be used for breeding of YY supermale. CQ and WC *O. niloticus* populations were introduced. The genetic sexes of CQ and WC are controlled strictly and not strictly by LG23 chromosome, respectively. YY supermales were obtained by crossing CQ XY male fish with WC XY female fish, and whether the F₁ YY male could be used for sex control was tested. The body weight, gonadal somatic index (GSI), serum hormone level and gonadal gene expression patterns in XY and YY individuals of F₁ generation were analyzed. A quarter of YY supermales were obtained in the F₁ generation of the progeny of CQ XY male and WC XY females. F₁ YY supermales were all male and fertile. F₁ YY supermales were crossed with WC XX female, WC XY female (dam), F₁ XX female and CQ XX female, and their offspring were almost all male. Two female fish were found in the progeny of the F₁ YY male and F₁ XX female, and the male ratio is 98%. At 180 days after hatching, there were no significant differences in body weight, GSI and serum hormone levels between F₁ XY and YY hybrids. Testicular gene expression analysis showed that the expression levels of *AmhX/AmhY* in YY were significantly higher than those of XY fish, while the expression levels of *Dmrt1* and *Cyp11b2* were not significantly different between XY and YY individuals. The physiological indexes of YY fish are highly similar to those of XY fish. Naturally sex-reversed XY female *O. niloticus* can be used for breeding YY supermale fish, which can be used for tilapia sex control.

Key words: *Oreochromis niloticus*; YY super-male; sex control; gene expression

Corresponding authors: SHI Hongjuan. E-mail: shihj@gdou.edu.cn;

LI Guangli. E-mail: ligl@gdou.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31702326); Program for Scientific Research Start-up Funds of Guangdong Ocean University