

人工诱导瓦氏黄颡鱼性逆转及雌核发育



熊阳¹, 胡景琦¹, 蒋有渤¹, 于贵杰¹, 蒋巍¹, 王旭¹, 孙瑞东¹, 陈见², 李佩², 李志³, 王德忠⁴, 吴建开⁴, 梅洁^{1*}

1. 华中农业大学水产学院, 湖北洪山实验室, 湖北武汉 430070; 2. 武汉市农业科学院水产研究所, 湖北武汉 430270; 3. 中国科学院水生生物研究所, 湖北武汉 430072; 4. 射阳康余水产技术有限公司, 江苏盐城 224300

第一作者: 熊阳, 从事鱼类遗传育种研究, E-mail: xiongyang2018@163.com



胡景琦, 从事鱼类遗传育种研究, E-mail: hujingqi@webmail.hzau.edu.cn

通信作者: 梅洁, 国家特支计划青年拔尖人才, 现代农业产业技术体系“黄颡鱼种质资源与品种改良”岗位科学家, 湖北省“杰青”。从事鱼类遗传育种研究, 培育了国家水产新品种杂交黄颡鱼“黄优1号”和黄颡鱼“全雄2号”。E-mail: jmei@mail.hzau.edu.cn



资助项目: 国家现代农业产业技术体系(CARS-46); 江苏省现代农业重点项目(BE2018348); 盐城渔业高质量发展重点项目(YCSCYJ2021013); 湖北省重点研发计划(2023BBA001)

收稿日期: 2023-12-01
修回日期: 2024-03-21

文章编号:
1000-0615(2025)03-039104-13
中图分类号: S 917.4
文献标志码: A

作者声明本文无利益冲突

©《水产学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)
Copyright © Editorial Office of Journal of Fisheries of China (CC BY-NC-ND 4.0)



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

黄颡鱼属包含黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*)、瓦氏黄颡鱼 (*P. vachelli*)、光泽黄颡鱼 (*P. nitidus*)、长须黄颡鱼 (*P. eupogon*) 和中间黄颡鱼 (*P. intermedius*)，其中黄颡鱼因肉质细嫩、营养价值高、抗逆性强、易养殖等特点，深受消费者喜爱。据《中国渔业统计年鉴》分析，2022年全国黄颡鱼养殖产量高达 59.9 万 t^[1]。黄颡鱼产业的快速发展

得益于育种和养殖技术的不断提升。黄颡鱼的雌雄个体间具有显著的生长差异, 同塘养殖条件下雄性黄颡鱼生长速率是雌性个体的2~3倍。我国科研工作者通过性别控制技术创制了黄颡鱼单性养殖品种“全雄1号”, 全雄黄颡鱼凭借雄性率高、生长速率快、经济价值高等特点, 迅速在全国范围内被推广养殖^[2-3]。随后, 以经2代群体选育的瓦氏黄颡鱼为父本, 经3代群体选育的黄颡鱼为母本, 培育了水产新品种杂交黄颡鱼“黄优1号”, 该新品种兼备生长速率快和耐运输等特点。同塘养殖环境下10月龄的雄性杂交黄颡鱼生长速率比雌性快约46%^[4]。此外, 雄性瓦氏黄颡鱼生长速率比雌性个体快。因此, 获得YY超雄瓦氏黄颡鱼对创制全雄杂交黄颡鱼和全雄瓦氏黄颡鱼具有重要的生产意义。

利用性别控制技术获得XY生理雌鱼是创制YY超雄瓦氏黄颡鱼最关键的一步。激素种类、处理方式、处理浓度和时间均会影响鱼类生长、存活率和性别转换效果^[5-7]。将鱼类由遗传型雄性转化为生理性雌性常用的雌激素有乙炔基雌二醇(ethinylestradiol, EE₂)^[2]、17 β -雌二醇(17 β -estradiol, E₂)^[5-7]、戊酸雌二醇(estriadiol valerate, EV)^[8]、雌酮(estrone, E₁)^[9]和苯甲酸雌二醇(estriol benzoate, EB)^[10]等。处理方式有激素浸浴法、投喂法、注射法和埋植法等, 其中投喂法的成本低且操作简单, 在鱼类雌性化过程中使用最多^[10]。鱼类雌性化过程中雌激素处理浓度与持续时间一般呈反比关系, 但激素浓度过高或处理时间太长, 均会抑制鱼体的生长以及降低存活率^[10]。此外, 经雌激素处理获得的XY生理雌鱼和正常雌性个体无法从形态上辨别, 通常需借助性别连锁分子标记进行遗传鉴定来确定其基因型。对于尚未开发性别连锁分子标记的鱼类, 需借助雌核发育获得超雄鱼或伪雄鱼。例如, 采用雌核发育与鱼类性别控制技术成功研发了YY超雄黄颡鱼^[2]和XX伪雄鲤(*Cyprinus carpio*)^[11]。此外, 雌核发育还能辅助推断鱼类基因型。例如, 采用雌核发育技术推测黄颡鱼^[2]和黄姑鱼(*Nibea albiflora*)^[12]等鱼类为雄性配子异型(XX/XY), 而半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)^[13]和大西洋鳕(*Gadus morhua*)^[14]等鱼类为雌性配子异型(ZZ/ZW)。人工诱导鱼类的雌核发育过程包括精子遗传物质失活和卵子染色体的二倍化。精子的遗传灭活

主要包括使用药物处理、X射线照射、 γ 射线照射和紫外灯照射的方法等, 其中紫外灯照射法因设备简单、操作方便且安全性高等特点使用最为普遍^[15]。诱导卵子染色体二倍化的方法主要有化学药物、静水压、热休克和冷休克处理等方式。化学药物处理存在药物毒性和子代中存在多倍体和嵌合体的缺点^[16]。静水压法对受精卵造成的损伤较小, 孵化率也相对较高, 但通常需要专业设备、人工操作复杂、处理数量有限^[17]。冷休克处理对大多数鱼类雌核发育的二倍化形成有效, 应用更为普遍^[18]。尽管瓦氏黄颡鱼基因组已公布, 但尚未开发出广谱性的性别连锁分子标记^[19]。因此, 探索瓦氏黄颡鱼雌核发育最佳条件有利于获得YY超雄瓦氏黄颡鱼和创制全雄瓦氏黄颡鱼和全雄杂交黄颡鱼新品种。

本课题以瓦氏黄颡鱼为研究对象, 探索EV和E₂的不同处理浓度, 及E₂不同处理时间对瓦氏黄颡鱼生长、存活率和性别比例的影响; 探索性逆转的瓦氏黄颡鱼雌鱼卵子受精后第二极体排出时间和雌核发育最佳条件, 以期获得YY超雄瓦氏黄颡鱼。

1 材料与方法

1.1 实验鱼来源

瓦氏黄颡鱼[♀:(130.56±32.58) g, ♂:(329.32±78.92) g]来源于射阳康余水产技术有限公司(江苏省盐城市), 而雄性黄颡鱼[(150.27±20.15) g]来源于华中农业大学实验基地。本研究获得了华中农业大学实验动物管理和使用伦理委员会批准(HZAUFI-2018-025), 实验过程中操作人员严格遵守伦理规范, 并按照华中农业大学伦理委员会制定的规章制度执行。

1.2 瓦氏黄颡鱼和杂交黄颡鱼生长对比

2018年6月在射阳康余水产技术有限公司进行瓦氏黄颡鱼的繁殖, 待完成饲料驯食后, 投放规格约为0.45 g, 养殖密度为1 000尾/hm², 进行人工养殖。随机捕捞2龄雌性和雄性瓦氏黄颡鱼各40尾, 随机捕捞4龄雌性瓦氏黄颡鱼11尾和雄性瓦氏黄颡鱼20尾进行拍照、体重测量和数据分析。

2020年6月在射阳康余水产技术有限公司杂交黄颡鱼的繁殖, 待完成饲料驯食后, 投放

规格为 0.40 g 左右, 养殖密度为 800 尾/hm², 进行人工养殖。随机捕捞 1 龄和 2 龄的雌性和雄性杂交黄颡鱼各 30 尾进行拍照、体重测量和数据分析。

1.3 雌二醇诱导性逆转

饲料制备 将 5、10、20 和 40 mg 的 EV (Selleck, 美国) 分别溶于 400 mL 95% 乙醇溶液中, 用喷壶均匀喷洒在 1 kg 饲料上, 放于 40 °C 烘箱中, 待乙醇挥发完全后, 放于通风干燥的地方保存。按照上述方法, 获得 20 和 40 mg/kg E₂ (Selleck, 美国) 的饲料。对照组的饲料仅喷 95% 的乙醇溶液, 烘干后备用。

不同浓度的 EV 和 E₂ 处理实验设计 参考黄颡鱼的性逆转实验^[5], 设置了对照组、5、10、20 和 40 mg/kg 的 EV 组及 20 和 40 mg/kg 的 E₂ 组, 共 7 个组合。每个组合设置 3 个平行, 每个平行随机放入 100 尾鱼苗。出膜后第 4 天 (4 dph, days-post hatching) 瓦氏黄颡鱼苗统一用丰年虫开口, 在 5 dph 开始驯 0.15 mm 微颗粒鱼苗饲料。在 7 dph 分别投喂对应浓度的激素饲料或不带激素的饲料 (对照组)。鱼苗饲养至 25 dph, 投喂带有激素的山东升索微颗粒配合饲料 S3 系列至 60 dph; 在 61 dph 投喂普通 0.6 mm 微颗粒饲料至 120 dph。每天 7: 00、14: 00 和 19: 00 分别进行饱食投喂, 30 min 后将剩余饲料捞出。

不同时长的 E₂ 处理实验设计 为了进一步探索投喂不同时长 E₂ 处理对瓦氏黄颡鱼性别分化的影响, 设置了对照组和 6 个时间梯度组合, 分别在孵化后 10~56、13~52、16~48、19~44 和 22~40 dph 投喂 20 mg/kg 的 E₂ 饲料, 其余时间投喂正常饲料。

1.4 生长、存活率和性别比例统计

在 EV 和 E₂ 不同浓度和不同处理时间的探索实验结束后, 在 61 dph 统计各组瓦氏黄颡鱼存活率, 随机选择 60 尾瓦氏黄颡鱼 (每个平行 20 尾) 用于体长和体重测量。EV 和 E₂ 不同浓度处理实验的瓦氏黄颡鱼被养殖至 180 dph, 而 E₂ 不同时间处理实验的瓦氏黄颡鱼被养殖至 90 dph, 随机选择 60 尾 (每个平行 20 尾) 用于性别比例统计。具体操作: 利用鱼安定 (MS-222, 100 mg/kg) 将瓦氏黄颡鱼麻醉后, 使用剪刀从肛门开始沿着两侧至胸鳍基部, 使用镊子

将多余内脏移除, 性腺紧靠后肾两侧。滴加少量波恩氏液将性腺染成黄色放置解剖镜下观察性腺形态, 使用电荷耦合器件相机 (Charge-Coupled Device, CCD) 连接电脑后拍照保存。剪取部分尾鳍保存在无水乙醇中用于 DNA 提取, 将性腺保存在 4% 多聚甲醛中 4 °C 过夜, 每种性腺类型随机挑选 5 个进行 H.E 染色分析。石蜡切片经脱水、透明、脱蜡, 然后利用苏木素染色细胞核及伊红染色细胞质, 脱水后封片进行显微镜观察并采集图像。

1.5 瓦氏黄颡鱼卵子受精后第二极体排出观察

瓦氏黄颡鱼卵子受精后用 1% 的胰蛋白酶溶液处理脱黏, 分别在受精后 2、4、6、8 和 10 min 收集 20 枚胚胎置于 EP 管中, 加入 4% 中性甲醛液并平放于摇床上, 4 °C 固定过夜。将固定好的胚胎用 PBS 缓冲清液洗 3 次 (每次 5 min), 在显微镜下剥去卵膜。胚胎使用 PBS 清洗 5 min 后, 0.1% Trion-100 PBS 透化 20 min, PBS 清洗 3 次 (每次 10 min); 使用 DAPI 室温避光孵育 20 min, 然后 PBS 清洗 5 次 (每次 15 min), 甘油透明 1 h 后, 滴加淬灭剂, 置于徕卡 SP8 共聚焦显微镜下拍照观察。

1.6 瓦氏黄颡鱼雌核发育

异源精子灭活 将黄颡鱼精巢剪碎, 加入精子保存液用研磨棒研磨充分后用 200 目纱网过滤掉精巢组织块, 浅铺在直径为 9 cm 的玻璃培养皿上, 厚度约 0.5 mm。垂直放在 2 根 30 W 紫外灯管正下方; 为灭活均匀在装精液的培养皿下放置摇床和冰盒, 使稀释后的精液距离紫外灯 10 cm。灭活时将摇床低速摇晃, 每 5 min 取少量精液放入显微镜下检查 1 次, 30 min 后灭活的精子活力为正常精子活力的一半, 精子停止灭活备用。

人工催产 将上述 E₂ 处理获得的 40 尾二龄性成熟的瓦氏黄颡鱼雌鱼 (150 g 左右) 进行 2 轮催产药物注射, 其中 36 尾瓦氏黄颡鱼能够正常排卵。两针间隔 12 h。第一针: LHRH-A2 10 µg/kg, 第二针: LHRH-A2 10 µg/kg 和 HCG 2000 IU/kg。

抑制第二极体排出 共设置 7 个组合, 每个组合 3 个平行。将灭活完成的黄颡鱼精子与瓦氏黄颡鱼混合卵子进行受精, 组合 1~5 分别在受精后 2、4、6、8 和 10 min 开始冷休克处理, 冷休克温度和持续时间参照黄颡鱼雌核

发育冷休克处理的最佳条件^[2], 即将受精卵放入4 °C冰水中20 min后, 立即转入25 °C的水中进行后续孵化。组合6使用灭活的黄颡鱼精子与瓦氏黄颡鱼卵子受精, 不进行冷激处理, 常温孵化作为单倍体对照。组合7使用瓦氏黄颡鱼精子与瓦氏黄颡鱼卵子受精作为正常二倍体对照。

1.7 瓦氏黄颡鱼雌核发育鉴定

使用盐析法提取上述雌核发育60日龄的鱼苗尾鳍DNA。参照胡伟华等^[4]设计的鉴定引物(F:5'-AGATGGTAATAAATCCCAGA-3'; R:5'-TGATTCCATTCTCGTCAGCC-3')鉴定黄颡鱼、杂交黄颡鱼和瓦氏黄颡鱼。PCR扩增程序: 94 °C 3 min, 34个循环(95 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 60 s), 72 °C 5 min。PCR结束后使用1%琼脂糖凝胶进行电泳。瓦氏黄颡鱼和黄颡鱼分别呈现279和1 005 bp条带, 而杂交黄颡鱼呈现279和1 005 bp两条带。

1.8 数据分析

使用Excel 2010和SPSS 19.0软件对所有

原始数据进行分析, 所得的实验数据以平均值±标准差(SD)呈现。对EV和E₂不同浓度处理的瓦氏黄颡鱼实验数据使用一般线性模型单变量进行双因素分析, 检测雌激素浓度和种类对测定指标的主要影响和交互作用。采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)检验不同年龄的瓦氏黄颡鱼和杂交黄颡鱼雌雄间体重差异, 以及17β-雌二醇不同时间处理的瓦氏黄颡鱼体长、体重、存活率和性别比例。

2 结果

2.1 瓦氏黄颡鱼和杂交黄颡鱼的两性生长差异

同塘养殖条件下, 2龄雄性瓦氏黄颡鱼体重可达(361.45±91.89)g, 而雌性瓦氏黄颡鱼的体重为(127.15±31.92)g(图1-a, b)。4龄雄性和雌性瓦氏黄颡鱼的体重分别为(832.00±97.20)g和(310.00±93.86)g(图1-c)。雄性瓦氏黄颡鱼的生长速率显著高于雌鱼。同塘养殖环境下, 1龄雄性杂交黄颡鱼体重为(143.63±14.87)g, 生长速率比雌性杂交黄颡鱼(103.37±9.25)g快38.95%(图1-d, e); 2龄雄性杂交黄颡鱼体重

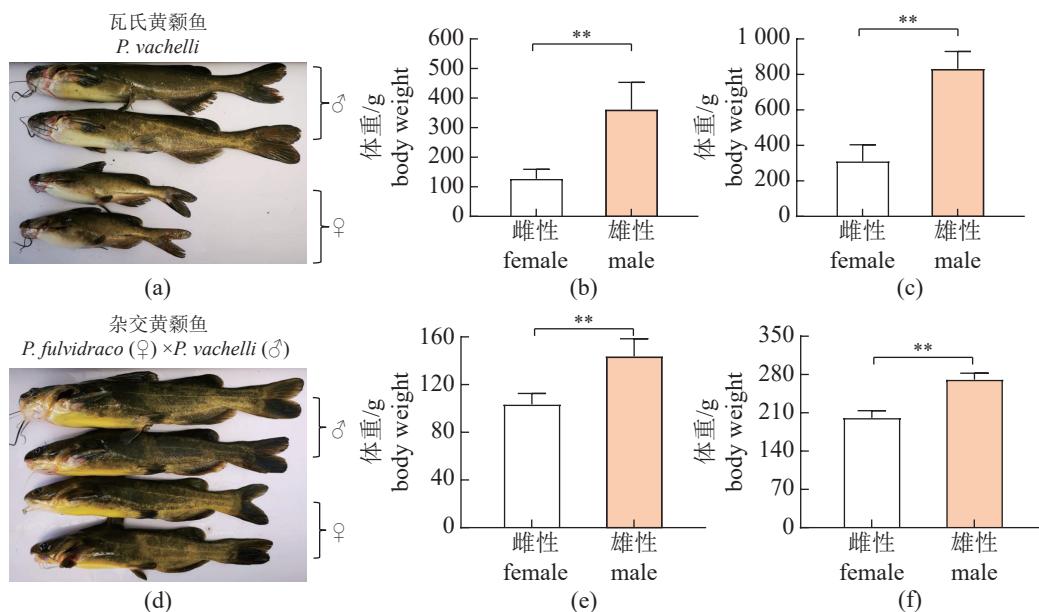


图1 不同年齡的瓦氏黃颡魚和雜交黃颡魚雌雄的體型和體重比較

(a) 2歲瓦氏黃颡魚雄性和雌性個體的形態比較, (b) 2歲瓦氏黃颡魚的兩性體重, (c) 4歲瓦氏黃颡魚的兩性體重, (d) 1歲雜交黃颡魚雌性和雄性個體的形態比較, (e) 1歲雜交黃颡魚的兩性體重, (f) 2歲雜交黃颡魚的兩性體重。“***”表示P<0.01。

Fig. 1 Comparative analysis of phenotype and body weight in male and female *P. vachelli* or hybrid catfish (*P. vachelli*♂×*P. fulvidraco*♀) at different ages

(a) phenotypes of two-year-old male and female *P. vachelli*, (b) body weight of two-year-old *P. vachelli*, (c) body weight of four-year-old *P. vachelli*, (d) phenotypes of one-year-old male and female hybrid catfish (*P. vachelli*♂×*P. fulvidraco*♀), (e) body weight of one-year-old hybrid catfish (*P. vachelli*♂×*P. fulvidraco*♀), (f) body weight of two-year-old hybrid catfish (*P. vachelli*♂×*P. fulvidraco*♀)。“***” indicates P<0.01.

为 (282.41 ± 21.87) g, 生长速率比雌性杂交黄颡鱼 (213.42 ± 15.88) g 快 32.32% (图 1-f)。

2.2 不同浓度 EV 和 E₂ 处理对瓦氏黄颡鱼生长、存活率和性别分化的影响

使用 EV 和 E₂ 来诱导瓦氏黄颡鱼从雄性向雌性逆转, 处理时间为 7~60 dph。投喂 EV 和 E₂ 组的瓦氏黄颡鱼的体长、体重和存活率均显著低于对照组, 其中体长和体重均随着浓度的升高而显著性降低 ($P<0.05$) (表 1)。对照组和 5 mg/kg EV 组的瓦氏黄颡鱼存活率无显著差异, 均显著高于 10、20 和 40 mg/kg EV 的瓦氏黄颡

鱼 ($P<0.05$); 投喂 E₂ 组的瓦氏黄颡鱼存活率都显著低于对照组。投喂 20 mg/kg E₂ 组的瓦氏黄颡鱼的体长、体重和存活率均显著高于投喂相同浓度的 EV 组 ($P<0.05$)。绝大多数死亡的瓦氏黄颡鱼呈现腹水和肝脏肿大等现象。投喂 40 mg/kg E₂ 组的瓦氏黄颡鱼仅体重显著高于相同浓度的 EV 组。瓦氏黄颡鱼的体长、体重和存活率受到雌二醇种类和浓度的显著影响 ($P<0.05$), 且体长和体重受到二者交互作用 ($P<0.05$), 但存活率不受二者交互作用影响 ($P>0.05$)。

表 1 不同浓度梯度 EV 和 E₂ 投喂条件下的 60 日龄瓦氏黄颡鱼体长、体重及存活率统计

Tab. 1 Statistics on body length, body weight and survival ratio of *P. vachelli* treated with different concentrations of EV and E₂ at 60 dph

雌激素类型 type of estrogen	浓度/(mg/kg) concentrations	体长/cm body length	体重/g body weight	存活率/% survival rate
对照组 control	0	5.78±0.30 ^{aA}	2.75±0.23 ^{aA}	93.67±2.52 ^{aA}
EV	5	5.20±0.19 ^b	2.11±0.17 ^b	90.17±3.51 ^{ab}
EV	10	4.43±0.09 ^c	1.61±0.07 ^c	83.33±4.16 ^b
EV	20	4.06±0.25 ^{dY}	1.37±0.10 ^{dY}	76.50±3.28 ^{bY}
EV	40	3.33±0.30 ^{eX}	1.03±0.09 ^{eY}	51.67±7.65 ^{eX}
E ₂	20	4.72±0.10 ^{BX}	1.81±0.11 ^{BX}	85.17±3.62 ^{BX}
E ₂	40	3.37±0.21 ^{CX}	1.07±0.12 ^{CX}	62.00±9.73 ^{CX}

注: 对EV不同浓度的数据显著性差异用“a, b, c, d, e”表示; 对E₂的不同浓度的数据显著性差异用“A, B, C”表示, 相同浓度的不同激素组间的数据差异用“X, Y”表示, 同列数据不同上标字母表示有显著差异($P<0.05$), 下同。

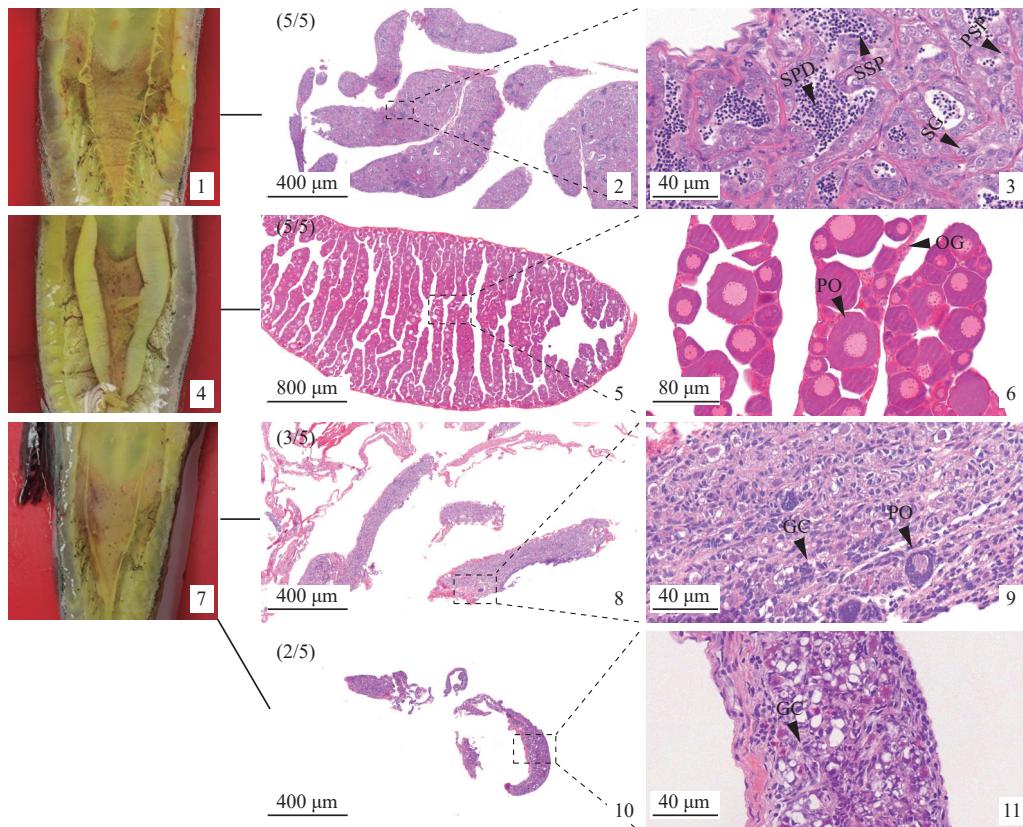
Notes: The significant differences in data for different concentrations of EV are represented in “a, b, c d, e”, and the significant differences in data for different concentrations of E₂ are represented in “A, B, C”. “X, Y” represent the significant differences in data for the same dose of EV and E₂. In the same line, different letter superscripts indicate significant differences ($P<0.05$), the same below.

在 180 dph 通过对 EV 和 E₂ 不同浓度处理各组间大量的解剖显微观察发现 3 种性腺类型: 正常精巢具有锯齿状精小叶, 正常卵巢呈膨大的棒状, 异常性腺呈光滑细线状 (图版 I -1, 4, 7)。性腺切片 H.E 染色的结果分别呈现为正常精巢中有结构完整的精原细胞、初级精母细胞和精子 (图版 I -2~3); 正常卵巢中初级卵母细胞较多 (图版 I -5~6); 异常性腺中只能观察少数几个初级卵母细胞, 切片中有较多的空泡, 生殖细胞数目少且辨识度低 (图版 I -8~11)。对照组中瓦氏黄颡鱼只观察到正常精巢和卵巢, 比例接近 1:1。20 和 40 mg/kg 的 EV 组和 E₂ 组的瓦氏黄颡鱼性腺均发育为正常卵巢。5 和 10 mg/kg 的 EV 组与对照组的瓦氏黄颡鱼的卵巢比例无显著差异, 而精巢比例显著低于对照

组, 异常性腺的比例显著高于对照组 (表 2)。综合生长、存活率和性逆转率等结果显示, 相同浓度的 E₂ 诱导瓦氏黄颡鱼性逆转效果优于 EV。

2.3 E₂ 的不同处理时间对瓦氏黄颡鱼生长、存活率和性别分化的影响

随着 E₂ 投喂时间的延长, 60 日龄的瓦氏黄颡鱼体长和体重逐渐降低, 均显著低于对照组。E₂ 投喂时间为 13~52 和 10~56 dph 两组瓦氏黄颡鱼的体长和体重无显著差异。所有组合中瓦氏黄颡鱼的存活率都在 85% 以上, 22~40 dph 处理组中瓦氏黄颡鱼的存活率与对照组无显著差异, 而其余 E₂ 处理时间组的存活率均显著低于对照组 (表 3)。

图版 I 不同浓度 EV 和 E₂ 处理后 180 日龄的瓦氏黄颡鱼的性腺表型

1.精巢波恩氏液染色; 2~3.精巢的 H.E 染色与对应的放大照; 4.卵巢波恩氏液染色; 5~6.卵巢的 H.E 染色与对应的放大照; 7.异常性腺波恩氏液染色; 8~11.异常性腺的 H.E 染色与对应的放大照。SG.精原细胞, PSP.初级精母细胞, SSP.次级精母细胞, SPD.精细胞, GC.生殖细胞, PO.初级卵母细胞, OG.卵原细胞。2、5、8 和 10 图中左上角的 (5/5), (3/5) 和 (2/5), 分母表示性腺的 H.E 染色切片总数, 分子表示性腺与呈现图片所示的表型一致的数目, 下同。

Plate I Gonadal phenotypes of *P. vachelli* treated with different concentrations of EV and E₂ at 180 dph

1. testis stained by Bouin's solution; 2-3. testis stained by hematoxylin-eosin and the corresponding magnified picture; 4. ovary stained by Bouin's solution; 5-6. ovary stained by hematoxylin-eosin and the corresponding magnified picture; 7. the abnormal gonads stained by Bouin's solution; 8-11. the abnormal gonads stained by hematoxylin-eosin and the corresponding magnified picture. SG. spermatogonia, PSP. primary spermatocytes, SSP. secondary spermatocytes, SPD. spermatids, GC. germ cell, PO. primary oocyte, OG. oogonia. (5/5), (3/5) and (2/5) showed in the left upper corner of figure 2, 5, 8, 10, of which the denominator means the total number of gonads of H.E staining and the numerator indicate the number of phenotypes consistent with the presented picture, the same below.

表 2 不同浓度梯度 EV 和 E₂ 投喂后 180 日龄的瓦氏黄颡鱼性腺类型统计Tab. 2 Statistics on the gonadal types of *P. vachelli* treated with different concentrations of EV and E₂ at 180 dph

雌激素类型 types of estrogen	浓度/(mg/kg) concentration	精巢/% testis	卵巢/% ovary	异常性腺/% abnormal gonad
对照组 control	0	53.33±12.58 ^{aA}	46.67±12.58 ^{bB}	0.00±0.00 ^{cA}
EV	5	45.00±5.00 ^a	46.67±2.89 ^b	8.33±2.89 ^b
EV	10	16.67±5.77 ^b	45.00±5.00 ^b	38.33±2.89 ^a
EV	20	0.00±0.00 ^{cX}	100.00±0.00 ^{aX}	0.00±0.00 ^{cX}
EV	40	0.00±0.00 ^{cX}	100.00±0.00 ^{aX}	0.00±0.00 ^{cX}
E ₂	20	0.00±0.00 ^{bX}	100.00±0.00 ^{aX}	0.00±0.00 ^{aX}
E ₂	40	0.00±0.00 ^{bX}	100.00±0.00 ^{aX}	0.00±0.00 ^{aX}

表 3 E₂ 不同时长投喂的瓦氏黄颡鱼在 60 日龄的体长、体重及存活率统计

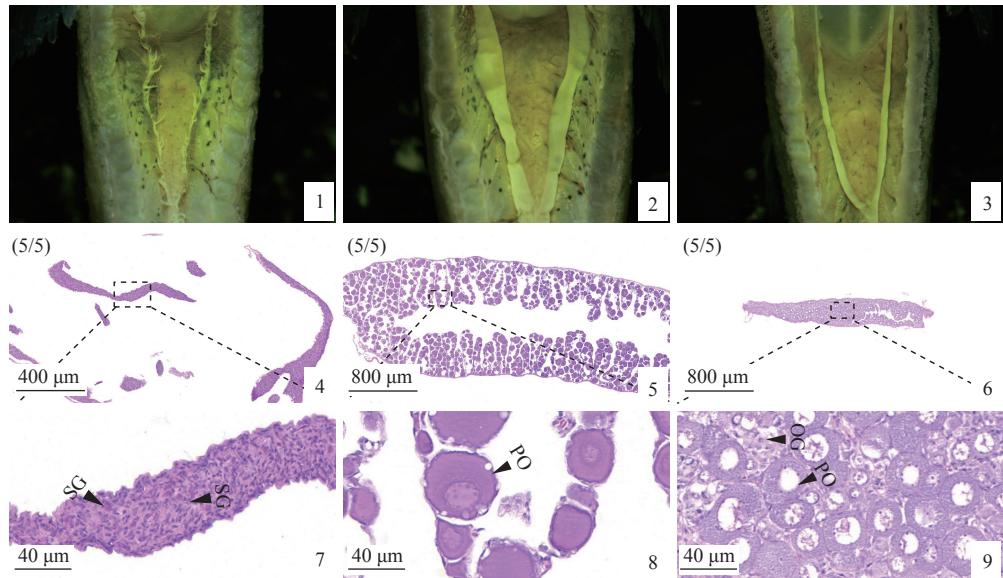
Tab. 3 Statistics on body length, body weight and survival ratios of *P. vachelli* treated with different treatment periods of E₂ at 60 dph

处理时间/dph treatment time	体长/cm body length	体重/g body weight	存活率/% survival ratio
0	5.77±0.21 ^a	2.67±0.10 ^a	95.83±0.76 ^a
22~40	5.61±0.14 ^b	2.58±0.12 ^b	92.33±1.26 ^{ab}
19~44	5.45±0.10 ^c	2.42±0.09 ^c	88.34±3.05 ^{bc}
16~48	5.12±0.41 ^d	2.21±0.13 ^d	86.00±3.61 ^{bc}
13~52	4.80±0.07 ^e	1.81±0.08 ^e	87.50±2.50 ^{bc}
10~56	4.79±0.08 ^e	1.80±0.08 ^e	85.50±6.06 ^e

通过解剖观察和性腺 H.E 染色结果观察到 3 种性腺类型：具有精小叶结构的精巢，具有大量初级卵母细胞的 A 类型卵巢和已分化部分初级卵母细胞的较细的 B 类型卵巢（图版 II）。精巢仅存在于对照组的瓦氏黄颡鱼，其余 E₂ 处理组的瓦氏黄颡鱼卵巢比例均高达 100%。A 类型卵巢的比例随 E₂ 处理时间的缩短而显著减少，而 B 类型卵巢比例随 E₂ 处理时间的缩短而显著增加（表 4）。

2.4 瓦氏黄颡鱼卵子受精后第二极体排出分析

减数分裂雌核发育是通过抑制第二极体排出而形成，利用 DAPI 染色示踪瓦氏黄颡鱼雌



图版 II 不同时间的 E₂ 处理后 90 日龄的瓦氏黄颡鱼的性腺表型

1. 精巢波恩氏液染色；2.A 型卵巢的波恩氏液染色；3.B 型卵巢的波恩氏液染色；4. 精巢的 H.E 染色图；5. A 型卵巢的 H.E 染色图；6. B 型卵巢的 H.E 染色图；7~9. 为 4~6 的对应放大照。

Plate II Gonadal phenotypes of *P. vachelli* treated with different times of E₂ at 90 dph

1. testis stained by Bouin's solution; 2. type A ovary stained by Bouin's solution; 3. type B ovary stained by Bouin's solution; 4. testis stained by hematoxylin-eosin; 5. type A ovary stained by hematoxylin-eosin; 6. type B ovary stained by hematoxylin-eosin; 7~9. the corresponding magnified pictures of 4~6.

表 4 E₂ 不同时长投喂的瓦氏黄颡鱼在 90 日龄性腺类型统计

Tab. 4 Statistics on gonadal types of *P. vachelli* treated with different treatment periods of E₂ at 90 dph

处理时间/dph treatment time	精巢/% testis	A类型卵巢/% type-A ovary	B类型卵巢/% type-B ovary	卵巢比例/% ovarian ratio
0	53.33±12.58 ^a	46.67±12.58 ^d	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^b
10~56	0.00±0.00 ^b	100.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^d	100.00±0.00 ^a
13~52	0.00±0.00 ^b	93.33±2.89 ^a	6.67±2.89 ^d	100.00±0.00 ^a
16~48	0.00±0.00 ^b	75.00±5.00 ^b	25.00±5.00 ^c	100.00±0.00 ^a
19~44	0.00±0.00 ^b	68.33±7.64 ^{bc}	31.68±7.64 ^b	100.00±0.00 ^a
22~40	0.00±0.00 ^b	60.00±5.00 ^c	40.00±5.00 ^a	100.00±0.00 ^a

雄原核和第二极体的动态发育过程(图2)。在水温25℃条件下,受精后4 min,第二极体和雌原核在一起尚未分开(图2-a);受精后6 min,第二极体开始与雌原核分开但未完全分开(图2-b);受精后8 min,第二极体与雌原核已完全分开,第二极体开始有凝缩现象(图2-c);受精后10 min,第二极体与雌原核越来越远,第二极体已经凝缩(图2-d)。

2.5 瓦氏黄颡鱼雌核发育及鉴定

前期已经开发了能准确鉴定瓦氏黄颡鱼、黄颡鱼及其杂交种的分子标记,因此选择黄颡鱼精子进行紫外线灭活开展瓦氏黄颡鱼雌核发育研究。雌激素处理组的瓦氏黄颡鱼卵子与精子授精后的受精率、孵化率和存活率分别为 $86.54\% \pm 3.22\%$ 、 $77.59\% \pm 5.71\%$ 和 $77.68\% \pm 5.25\%$ (表5),表明瓦氏黄颡鱼卵子质量较好。当瓦氏黄颡鱼卵子与紫外灭活的黄颡鱼精子授精后孵化率和存活率分别为 $28.09\% \pm 5.60\%$ 和 $2.88\% \pm 1.77\%$,在胚胎发育后期和卵黄苗期出现典型单倍体所呈现的脊柱弯曲、断裂和心包水肿等症状后死亡,至于出现极少数正常鱼苗,可能是自然加倍或精子灭活不彻底授精后获得的杂交黄颡鱼苗。从表5可以看出,受精后6 min开始冷休克处理的受精率、孵化率和4日龄苗种存活率显著高于其他组。通过能准确鉴定瓦氏黄颡鱼、黄颡鱼及其杂交种的分子标记对不同处理组的所有个体进行鉴定(图3),各组雌核发育

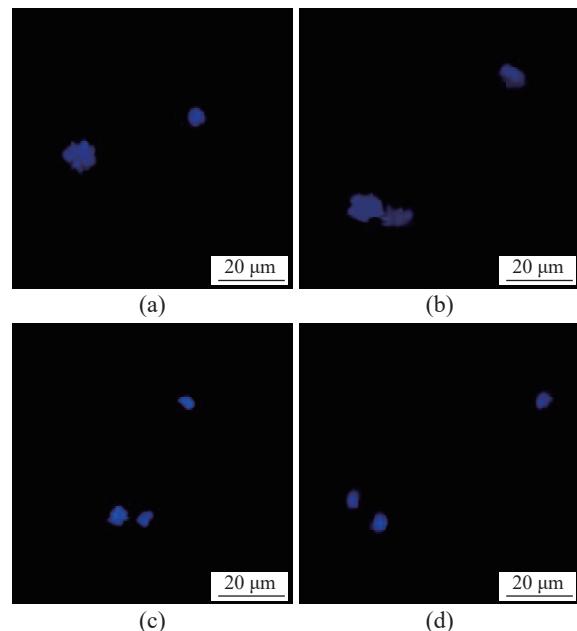


图2 瓦氏黄颡鱼受精卵第二极体排出过程

(a)–(d) 瓦氏黄颡鱼受精后4、6、8和10 min; DAPI染色标记细胞核(蓝色荧光)。

Fig. 2 Extrusion of the second polar body in the fertilized eggs of *P. vachelli*

(a)–(d) 4, 6, 8 and 10 min after fertilization of *P. vachelli*; nucleus were stained with DAPI (blue fluorescence).

率均在86%以上,共鉴定到62尾经雌核发育获得的瓦氏黄颡鱼。解剖其中10尾雌核发育个体,3尾为雄性瓦氏黄颡鱼,7尾为雌性瓦氏黄颡鱼,推断3尾雄性瓦氏黄颡鱼为YY超雄鱼。

表5 不同冷休克开始处理时间条件下的受精率、孵化率、苗种存活率和雌核发育率统计分析

Tab. 5 Statistics of different starting times for cold-shocked gynogenesis on the fertilization rate, hatching rate, survival rate and gynogenetic rate

组别 group	开始时间/min starting time	处理卵数 number of treatment eggs	受精率/% fertilization rate	孵化率/% hatching rate	4日龄存活率/% survival rate	雌核发育率/% gynogenetic rate
1		252±39.88	86.54±3.22 ^a	77.59±5.71 ^a	77.68±5.25 ^a	
2		246±41.19	73.22±4.94 ^b	28.09±5.68 ^c	2.88±1.77 ^d	
3	2	274±29.26	33.04±3.33 ^d	21.53±4.74 ^c	17.46±2.50 ^c	(9) 90.00
4	4	245±25.39	29.18±4.99 ^d	24.69±3.80 ^c	17.43±6.21 ^c	(8) 88.89
5	6	236±43.32	41.95±6.50 ^c	38.62±4.49 ^b	27.72±5.00 ^b	(28) 87.50
6	8	243±43.66	36.58±6.95 ^{cd}	32.10±2.59 ^{bc}	17.24±3.64 ^c	(13) 86.67
7	10	242±26.29	32.74±2.41 ^d	25.94±5.59 ^c	9.25±2.31 ^d	(6) 100.00

注:1组为正常对照,瓦氏黄颡鱼卵子与精子授精;2组为单倍体对照,瓦氏黄颡鱼卵子与紫外灭活黄颡鱼精子授精后未经过冷激处理;3~7组为瓦氏黄颡鱼卵子与紫外灭活黄颡鱼精子授精,受精后不同时间开始冷休克处理组。()中数字为每组获得的雌核发育个体的总数。

Notes: Group 1 was the normal control that oocytes of *P. vachelli* were fertilized with the sperms; group 2 was the haploid control that oocytes of *P. vachelli* were fertilized with genetic inactivated sperms of *P. fulvidraco*; group 3–7 were the gynogenetic groups with different starting times on the fertilized eggs from oocytes of *P. vachelli* and genetic inactivated sperms of *P. fulvidraco*. The datas in () are total number of gynogenetic fish.

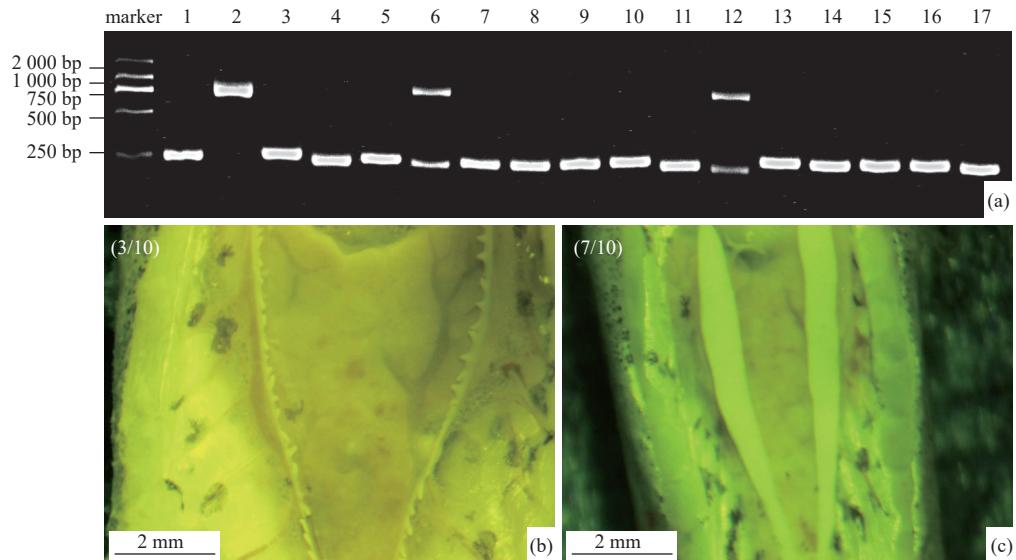


图3 瓦氏黄颡鱼雌核发育子代的遗传和性腺鉴定

(a) 瓦氏黄颡鱼、黄颡鱼及杂交黄颡鱼的分子标记鉴定图, 1.瓦氏黄颡鱼; 2.黄颡鱼; 3~17. 待鉴定的雌核发育个体, 其中6和12为杂交子代, 其余个体为雌核发育获得的瓦氏黄颡鱼; (b, c). 雌核发育瓦氏黄颡鱼的性腺观察。10尾鱼被解剖观察, 其中有3尾雄性和7尾雌性。

Fig. 3 Genetic and gonadal identification of offsprings of gynogenetic *P. vachelli*

(a) molecular marker identification of *P. vachelli*, *P. fulvidraco* and their hybrid offspring. 1. *P. vachelli*, 2. *P. fulvidraco*, 3~17 were gynogenetic fish to be identified, of which 6 and 12 were identified as the hybrid offspring, and other fish were identified to be gynogenetic *P. vachelli*; (b, c). observation of gonads in the gynogenetic *P. vachelli*. Ten gynogenetic fish were dissected, in which 3 were males and 7 were females.

3 讨论

生长是鱼类遗传改良中最有价值的经济性状之一, 部分鱼类雌雄个体间具有较大的生长速度差异, 培养全雄性或全雌性的水产养殖品种对渔业发展具有重要意义。大多数鮈类的雌雄个体间存在显著的生长差异, 例如黄颡鱼、乌苏里拟鲿(*Pseudobagrus ussuriensis*)和斑点叉尾鮰(*Ictalurus punctatus*)的雄性比雌性生长速率快, 而南方大口鮰(*Silurus meridionalis*)的雌性比雄性生长速率快^[20]。在相同养殖条件下, 2龄和4龄雄性瓦氏黄颡鱼的生长速率显著高于雌性瓦氏黄颡鱼, 而1龄和2龄雄性杂交黄颡鱼的生长速率显著高于雌性杂交黄颡鱼。

因此, 利用鱼类性别控制技术获得生长速率较快的全雄瓦氏黄颡鱼和全雄杂交黄颡鱼具有重要生产意义, 而通过性别控制技术获得超雄瓦氏黄颡鱼是最关键的一步。

为了高效获取优质XY生理雌鱼, 本研究探索了不同处理浓度的EV和E₂对瓦氏黄颡鱼的生长和性腺分化的影响。虽然高浓度的EV(20和40 mg/kg)处理的瓦氏黄颡鱼雌性化比率高达100%, 但其生长速率和存活率都显著下

降, 而低浓度的EV处理的瓦氏黄颡鱼存在性逆转不彻底的现象。外源性的EV能促进生物体内雌二醇的分泌, 饲料中添加EV能有效延缓黄鳍自然性逆转的现象^[21]。在性腺分化期间, 每周浸泡400 μg/L EV 2次持续4周可获得全雌性的虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*), 但存活率、生长速率和饲料转化率均显著受到抑制^[22]。饲料中添加EV投喂可获得70%~76%的雌性高身丽脂鲤(*Astyanax altiparanae*)^[23]。相同浓度E₂处理的瓦氏黄颡鱼的体长、体重和存活率均优于EV处理组, 且雌性率也高达100%。E₂是生物体内最具有代表性的天然雌激素之一, 在多种鱼类中已开展E₂诱导性别逆转研究。本研究中40 mg/kg E₂处理瓦氏黄颡鱼的体重和存活率显著低于20 mg/kg E₂处理组。E₂处理能显著促进能量在肝脏的分配, 但在摄食量上无显著影响, 所以E₂对鱼类生长的抑制由能量分配差异引起, 而不是能量获取差异引起^[24]。因此, 进一步探索使用20 mg/kg E₂对瓦氏黄颡鱼进行不同时间处理。所有E₂处理组的瓦氏黄颡鱼的性腺均发育为卵巢, 其中从22 dph开始处理, 至40 dph组的体长、体重和存活率最接近对照组的瓦氏黄颡鱼。在15~75 dph期间, 投喂添加

50~100 mg/kg 的 E₂ 的饲料可使大口黑鲈 (*Micropodus salmoides*) 100% 雌性化, 但生长速率仍显著低于对照组^[25]。斑点叉尾鮰从开口时期直至 30 dph 开展不同剂量的 E₂ 投喂, 30 μg/g E₂ 处理组具有较快生长速率, 但不能实现 100% 雌性化, 而 60 μg/g E₂ 处理组能实现全部逆转, 但生长受到抑制^[6]。在红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*) 中, E₂ 浓度过高生长受到抑制且存活率显著性降低, 而 E₂ 浓度过低或处理时间太短, 会出现逆转不彻底的现象^[26]。鱼类性别控制时间通常在性别分化期间。瓦氏黄颡鱼 8 dph 形成生殖脊, 14 dph 形成原始性腺, 直到 23 dph 时开始性分化, 且卵巢分化比精巢早^[27]。22~40 dph 为瓦氏黄颡鱼性腺分化的关键时间, 在此期间用 E₂ 处理的逆转效果较好, 对鱼体生长影响小。

目前尚未发现广谱性的瓦氏黄颡鱼性别连锁分子标记, 为了从性逆转的瓦氏黄颡鱼中获得 YY 瓦氏黄颡鱼, 根据已发表的黄颡鱼、异囊鮰 (*Heteropneustes fossilis*)、非洲胡子鮰 (*Clarias gariepinus*)、长吻鮰 (*Leiocassis longirostris*) 和兰州鮰 (*Silurus lanzhouensis*) 等结果, 设计瓦氏黄颡鱼雌核发育试验。使用 DAPI 染色与共聚焦 3D 成像技术可以追踪鱼类生殖细胞减数分裂的过程有助于冷休克时间点参考。Wang 等^[28] 发现兰州鮰受精卵在 24 °C 时第二极体与雌原核分离的时间点是受精后 7 min。研究发现 25 °C 受精后 6 min, 瓦氏黄颡鱼的第二极体开始与雌原核分开但未完全分开。从多次诱导瓦氏黄颡鱼雌核发育的实验总结发现受精后 6 min, 水温 4 °C, 处理时间 20 min, 转移至 25 °C 孵化的受精率、孵化率及二倍体存活率最佳。黄颡鱼、异囊鮰和非洲胡子鮰在受精后 1~2 min 开始冷休克处理, 雌核二倍体的存活率最高^[2, 29-30]。长吻鮰在受精后 9 min 开始处理, 冷休克 20 min, 雌核二倍体的存活率最高^[31]。兰州鮰则在受精后 6 min 开始处理, 冷休克 25 min 效果最佳^[32]。通常鱼类卵子处于第二次减数分裂后期, 受精后 3~10 min 内排出第二极体, 一般在受精后选择第二极体与雌原核开始分离时进行冷休克处理, 可以较好地抑制第二极体排出获得较高成活率。不同鱼类的精子灭活的紫外照射条件不尽相同。在条石鲷的雌核发育中, 使用紫外交联仪下照射同源精子 60 s 即可

达到完全灭活的效果, 微卫星标记鉴定后代中未混入父本的遗传信息^[33]。在兰州鮰的雌核发育中, 异源黄颡鱼精子在距离紫外灯 10~15 cm 的位置照射 10~15 min, 在所检查的后代中均为雌核发育的后代^[28]。本研究中黄颡鱼精子在距离紫外灯 10 cm 的位置照射了 30 min, 经过分子标记鉴定仍存在极少数杂交黄颡鱼, 可能是黄颡鱼精子灭活不够彻底引起的, 黄颡鱼精子灭活的最佳条件仍需进一步探索。对于精子灭活的判断标准, 目前一般采用普通光学显微镜检查灭活后精子的活力, 需要丰富的雌核发育经验, 使用计算机辅助精子分析系统 (CASA) 对灭活后的精子活力进行检测能提供科学的数据参考^[34]。基因组测序结果显示瓦氏黄颡鱼的性染色体为 XX/XY^[35]。由于缺乏广谱性的性别特异分子标记, 无法区分性逆转的 XY 生理雌性和 XX 雌性瓦氏黄颡鱼, 需利用人工雌核发育推断基因型。XY 生理雌性瓦氏黄颡鱼的子代有 YY 雄性和 XX 雌性, 而 XX 雌性瓦氏黄颡鱼的子代只有 XX 雌性。随机从 62 尾雌核发育的瓦氏黄颡鱼中挑选 10 尾, 解剖检查到 3 尾雄性瓦氏黄颡鱼, 可能为 YY 超雄瓦氏黄颡鱼, 还需与 XX 雌鱼测交进一步验证。后续将利用雌核发育获得的 YY 超雄瓦氏黄颡鱼进行 2b-RAD 和重测序技术筛选 Y 染色体特异性片段, 开发广谱性的瓦氏黄颡鱼性别连锁分子标记。

综上所述, 使用 20 mg/kg E₂ 从瓦氏黄颡鱼孵化后 22~40 dph 处理, 可获得 100% 雌性瓦氏黄颡鱼, 且对其生长速率和存活率影响最小。在瓦氏黄颡鱼受精后 6 min, 水温 4 °C, 冷休克时间为 20 min, 孵化温度为 25 °C 时雌核发育的受精率、孵化率和存活率最佳。对瓦氏黄颡鱼性逆转和雌核发育的探索有利于瓦氏黄颡鱼和杂交黄颡鱼的单性育种, 推动黄颡鱼产业的发展。

参考文献 (References):

- [1] 农业农村部渔业渔政管理局. 2022 年中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2023.
- [2] Fisheries Bureau of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs. China fishery statistical yearbook 2022[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2023 (in Chinese).
- [3] 刘汉勤, 崔书勤, 侯昌春, 等. 从 XY 雌鱼雌核发育产生 YY 超雄黄颡鱼 [J]. 水生生物学报, 2007, 31(5): 718-725.

- Liu H Q, Cui S Q, Hou C C, et al. YY supermale generated gynogenetically from XY female in *Pelteobagrus fulvidraco* (Richardson)[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, 31(5): 718-725 (in Chinese).
- [3] Dan C, Mei J, Wang D, et al. Genetic differentiation and efficient sex-specific marker development of a pair of Y- and X-linked markers in yellow catfish[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2013, 9(10): 1043-1049.
- [4] 胡伟华, 丹成, 郭稳杰, 等. 黄颡鱼和杂交黄颡鱼“黄优1号”形态及性腺发育的比较 [J]. *水生生物学报*, 2019, 43(6): 1231-1238.
- Hu W H, Dan C, Guo W J, et al. The morphology and gonad development of *Pelteobagrus fulvidraco* and its interspecific hybrid “Huangyou No. 1” with *Pelteobagrus vachelli*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2019, 43(6): 1231-1238 (in Chinese).
- [5] 王成龙, 关文志, 李永强, 等. 17 β -雌二醇诱导黄颡鱼雌性化的研究 [J]. *南方水产科学*, 2020, 16(3): 25-30.
- Wang C L, Guan W Z, Li Y Q, et al. Study on 17 β -estradiol induced feminization of *Pelteobagrus fulvidraco*[J]. *South China Fisheries Science*, 2020, 16(3): 25-30 (in Chinese).
- [6] 徐思琪, 张世勇, 段永强, 等. 17 β -雌二醇诱导斑点叉尾鮰雌性化研究 [J]. *水生生物学报*, 2022, 46(11): 1668-1674.
- Xu S Q, Zhang S Y, Duan Y Q, et al. Feminization of channel catfish induced by 17 β -estradiol[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2022, 46(11): 1668-1674 (in Chinese).
- [7] Pan Z J, Zhu C K, Chang G L, et al. Differential expression analysis and identification of sex-related genes by gonad transcriptome sequencing in estradiol-treated and non-treated Ussuri catfish *Pseudobagrus ussuriensis*[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2021, 47(2): 565-581.
- Lei B L, Kang J, Yu Y X, et al. β -estradiol 17-valerate affects embryonic development and sexual differentiation in Japanese medaka (*Oryzias latipes*)[J]. *Aquatic toxicology*, 2013, 134(1): 128-134.
- [9] Ankley G T, Feifarek D, Blackwell B, et al. Re-evaluating the significance of estrone as an environmental estrogen[J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(8): 4705-4713.
- [10] Pandian T J, Sheela S G. Hormonal induction of sex reversal in fish[J]. *Aquaculture*, 1995, 138(1-4): 1-22.
- [11] 吴清江, 陈荣德, 叶玉珍, 等. 鲤鱼人工雌核发育及其作为建立近交系新途径的研究 [J]. 遗传学报, 1981, 8(1): 50-55.
- Wu Q J, Chen D R, Ye Y Z, et al. Investigation on the carp gynogenesis with reference to establishing a pure line[J]. *Acta Genetica Sinica*, 1981, 8(1): 50-55 (in Chinese).
- [12] Chen R Y, Lou B, Xu D D, et al. Induction of meiotic gynogenesis in yellow drum (*Nibea albiflora*, Sciaenidae) using heterologous sperm and evidence for female homogametic sex determination[J]. *Aquaculture*, 2017, 479: 667-674.
- [13] 张全启, 王旭波, 刘金相. 半滑舌鳎性别决定和性别控制育种研究进展与展望 [J]. 中国海洋大学学报, 2019, 49(10): 43-53.
- Zhang Q Q, Wang X B, Liu J X. Progress and prospects of sex determination and sex control in Chinese tongue sole *Cynoglossus semilaevis*[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2019, 49(10): 43-53 (in Chinese).
- [14] Whitehead J A, Benfey T J, Martin-Robichaud D J. Ovarian development and sex ratio of gynogenetic Atlantic cod (*Gadus morhua*)[J]. *Aquaculture*, 2012, 324-325: 174-181.
- [15] 钟汶蓉. 二倍体泥鳅的雌核发育及性逆转技术研究 [D]. 大连: 大连海洋大学, 2023.
- Zhong W R. Induction of meiotic gynogenesis and sex reversal in diploid *Misgurnus anguillicaudatus*[D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2023 (in Chinese).
- [16] Refstie T. Tetraploid rainbow trout produced by cytochalasin B[J]. *Aquaculture*, 1981, 25(1): 51-58.
- [17] 李勇明, 桂彬, 黎阳雨, 等. 静水压诱导翘嘴鲌雌核发育的研究 [J]. *水生生物学报*, 2022, 46(5): 735-740.
- Li Y M, Gui B, Li Y Y, et al. Preliminary study on gynogenesis of *Siniperca chuatsi* induced by hydrostatic pressure[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2022, 46(5): 735-740 (in Chinese).
- [18] 刘海金, 侯吉伦, 刘奕. 牙鲆雌核发育研究进展 [J]. 中国水产科学, 2017, 24(4): 902-912.
- Liu H J, Hou J L, Liu Y. Gynogenesis in Japanese flounder: a review[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(4): 902-912 (in Chinese).
- [19] Li J, Wang T, Liu W, et al. A high-quality chromosome-level genome assembly of *Pelteobagrus vachelli* provides insights into its environmental adaptation and population history[J]. *Frontiers in Genetics*, 2022, 13: 1050192.
- [20] 梅洁, 桂建芳. 鱼类性别异形和性别决定的遗传基础及其生物技术操控 [J]. 中国科学: 生命科学, 2014, 44(12): 1198-1212.
- Mei J, Gui J F. Genetic basis and biotechnological manipulation of sexual dimorphism and sex determination in fish[J]. *Science China Life Sciences*, 2015, 58(2): 124-136 (in Chinese).
- [21] 储张杰. 黄鳍性逆转调控途径的研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.

- Chu Z J. Studies on the sex reversal regulation of *Monopterus albus* (Zuiwei)[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2008 (in Chinese).
- [22] Yusuf G, Senol G, Kenan G. Effect of estradiol valerate applied by immersion and oral administration on growth and sex reversal of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*[J]. *Biotechnology*, 2005, 4: 202-205.
- [23] Bem J C D, Fontanetti C S, Senhorini J A, et al. Effectiveness of estradiol valerate on sex reversion in *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae)[J]. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 2012, 55(2): 283-290.
- [24] 王凌宇, 齐飘飘, 陈敏, 等. 性类固醇激素对黄颡鱼雌雄生长二态性的影响 [J]. *水生生物学报*, 2020, 44(2): 379-388.
- Wang L Y, Qi P P, Chen M, et al. Effects of sex steroid hormones on sexual size dimorphism in yellow catfish (*Tachysurus fulvidraco*)[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2020, 44(2): 379-388 (in Chinese).
- [25] Du J X, Zhou J H, Li S J, et al. Timing of early gonadal differentiation and effects of estradiol-17 β treatments on the sex differentiation in largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2022, 48(3): 805-815.
- [26] Yan H W, Shen X F, Jiang J M, et al. Gene expression of *Takifugu rubripes* gonads during AI- or MT-induced masculinization and E₂-induced feminization[J]. *Endocrinology*, 2021, 162(10): bqab068.
- [27] 程晓春, 林丹军, 尤永隆. 温度对江黄颡鱼性分化的影响 [J]. *动物学研究*, 2007, 28(1): 73-80.
- Chen X C, Lin D J, You Y L. Influence of temperature on sex differentiation of teleost, *Pseudobagrus vachelli*[J]. *Zoological Research*, 2007, 28(1): 73-80 (in Chinese).
- [28] Wang T, Li Z, Yu Z X, et al. Production of YY males through self-fertilization of an occasional hermaphrodite in Lanzhou catfish (*Silurus lanzhouensis*)[J]. *Aquaculture*, 2021, 539: 736622.
- [29] Gheyas A A, Mollah M F A, Islam M S, et al. Cold-Shock Induction of diploid gynogenesis in stinging catfish, *Heteropneustes fossilis*[J]. *Journal of Applied Aquaculture*, 2001, 11(4): 27-40.
- [30] Volckaert F A M, Galbusera P H A, Hellemans B A S, et al. Gynogenesis in the African catfish (*Clarias gariepinus*). I. Induction of meiogynogenesis with thermal and pressure shocks[J]. *Aquaculture*, 1994, 128(3-4): 221-233.
- [31] Dai S M, Zhou Y L, Guo X F, et al. Sex-specific markers developed by genome-wide 2b-RAD sequencing confirm an XX/XY sex determination system in Chinese longsnout catfish (*Leiocassis longirostris*)[J]. *Aquaculture*, 2022, 549: 737730.
- [32] 李兰兰, 肖伟, 邢露梅, 等. 雌核发育兰州鮰胚胎发育和形态特征的研究 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2020, 42(5): 820-828.
- Li L L, Xiao W, Xing L M, et al. Study on morphological characteristics and embryonic development of the gynogenesis *Silurus lanzhouensis*[J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2020, 42(5): 820-828 (in Chinese).
- [33] 刘明涛. 条石鲷性别控制技术的初步研究 [D]. 舟山: 浙江海洋大学, 2023.
- Liu M T. A preliminary study on sex control techniques of rock bream (*Oplegnathus fasciatus*)[D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2023 (in Chinese).
- [34] 李志, 鲁蒙, 周莉, 等. 外源精子基因组整入雌核生殖银鲫卵子创制异源八倍体的有效方法 [J]. *水生生物学报*, 2020, 44(1): 26-35.
- Li Z, Lu M, Zhou L, et al. An effective method for creating allo-octoploids by integrating exogenous sperm genome into gibel carp eggs[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2020, 44(1): 26-35 (in Chinese).
- [35] Gong G R, Ke W S, Liao Q, et al. A chromosome-level genome assembly of the darkbarbel catfish *Pelteobagrus vachelli*[J]. *Scientific Data*, 2023, 10(1): 598.

Artificially induced sex-reversal and gynogenesis in darkbarbel catfish (*Pelteobagrus vachelli*)

XIONG Yang¹, HU Jingqi¹, JIANG Youbo¹, YU Guijie¹, JIANG Wei¹, WANG Xu¹, SUN Ruidong¹, CHEN Jian², LI Pei², LI Zhi³, WANG Dezhong⁴, WU Jiankai⁴, MEI Jie^{1*}

1. Hubei Hongshan Laboratory, College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Fisheries Research Institute, Wuhan Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430207, China;

3. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China;

4. Sheyang Kangyu Fisheries Technology Co., Ltd., Yancheng 224300, China

Abstract: *Pelteobagrus vachelli* and hybrid yellow catfish (*P. vachelli*♂×*P. fulvidraco*♀) exhibit significantly sexual dimorphism in growth. To obtain monosex populations of *P. vachelli* and hybrid catfish with improved growth performances, we investigated sex control technology and gynogenesis to produce YY super-male *P. vachelli*. First, we explored the effects of different dosages of estradiol valerate (EV) and 17β-estradiol (E₂), as well as various treatment periods of E₂, on gonadal differentiation, growth, and survival rate of *P. vachelli*. Then, the sex-reversed fish were used to identify the best condition for gynogenesis. Results showed that lower EV treatments (5 and 10 mg/kg) led to incomplete sex reversal in *P. vachelli* during 7–60 day-post hatching (dph). In contrast, 20 and 40 mg/kg E₂ treatments resulted in complete feminization, with significantly higher body length, body weight, and survival rate compared to EV-treated fish. The feminization rate of *P. vachelli* treated with 20 mg/kg E₂ was 100% during 22–40 dph, with growth performance and survival rate comparable to the control group. Cytological observations revealed that the separation of the second polar body from the female pronucleus of the fertilized egg occurred as early as 6 min post-fertilization at 25 °C. We optimized gynogenesis conditions by applying cold shock at 4 °C for 20 min to eggs at 6 min post-fertilization. A total of 62 gynogenetic fish were identified using a pair of genetic markers that efficiently distinguished yellow catfish, darkbarbel catfish, and their interspecific hybrids. Of these, 10 gynogenetic fish were sacrificed, and three were males, inferred to be YY super-males. Our results indicate that E₂ treatment efficiently induces feminization of *P. vachelli*, and YY super-males can be obtained through gynogenesis of feminized *P. vachelli*. This laid the foundation for the improvement and cultivation of all-male *P. vachelli* and all-male hybrid yellow catfish (*P. vachelli*, ♂×*P. fulvidraco*, ♀).

Key words: *Pelteobagrus vachelli*; 17β-estradiol; sex reversal; gynogenesis

Corresponding author: MEI Jie. E-mail: jmei@mail.hzau.edu.cn

Funding projects: China Agriculture Research System (CARS-46); Modern Agriculture Project of Science and Technology Department of Jiangsu Province (BE2018348); Key Projects for the High-Quality Development of Yancheng Fisheries Industry (YCSCTJ2021013); Key Research and Development Project of Hubei Province (2023BBA001)