

单红,周国勤,陈树桥,等. 人工诱导对鱼类性别分化和性别决定的影响综述[J]. 江苏农业科学,2014,42(1):197-199.

人工诱导对鱼类性别分化和性别决定的影响综述

单红,周国勤,陈树桥,茆健强

(江苏省南京市水产科学研究所,江苏南京 210036)

摘要:鱼类性别控制对于水产养殖具有十分重要的指导意义。目前用于生产实践的鱼类人工性别控制方法有很多,包括温度、外源激素和芳香化酶抑制剂等,但大多数仍然处于探索与试验阶段。本文通过对鱼类性别决定机制、相关基因及人工诱导鱼类性别分化的方法等方面国内外研究进展的阐述,为鱼类性别控制、调控养殖鱼类的经济性状等提供有益的参考。

关键词:鱼类;性别决定;性别分化;人工诱导

中图分类号:S917 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)01-0197-03

鱼类性别决定的基因型在受精时就已经形成,但作为一种低等脊椎动物,千差万别的生活环境决定了其性别决定方式的多样化。大量研究表明,雌雄异体鱼类的性别决定除受遗传因素的控制外,也容易受到环境因素诸如温度、光照、水质和外源激素等的影响。因此,多年来在鱼类养殖生产实践中,对于一些雌、雄鱼经济性状差异较大的养殖鱼类,人们一直探索着如何通过人工诱导的方式提高养殖群体中雌鱼或雄鱼的比例,以提高养殖产量和获得经济价值高(如生长率和个体大小等)的商品鱼。因此,研究鱼类的性别决定以及各种人为因素对性别分化的影响,在鱼类发育生物学理论上和养殖生产实践上都具有重要的意义。

1 鱼类性别决定及相关基因

鱼类性别决定机制非常复杂,几乎具有所有脊椎动物的性别决定方式,存在从雌雄同体到雌雄异体的各种性别类型,性逆转是鱼类中较为常见的现象。与其他高等脊椎动物不同,在许多鱼类中决定性别的基因不明显地集中于性染色体,常染色体上的基因也参与到性别决定中,这些基因共同决定

和控制鱼类的初始性别。近年来,随着分子生物学技术的发展,鱼类性别决定相关基因的研究取得了一些重要进展。其中,研究较多的有 *DMY* 基因、芳香化酶基因、*Sox* 基因家族和 *Dmrt* 基因家族等,这为从分子水平上阐明鱼类的性别决定和分化机制奠定了基础。

1.1 *DMY* 基因

DMY (DM domain gene on Y-chromosome) 基因是在青鳉 (*Oryzias latipes*) 体内发现的 1 个性别决定基因,也是首次在非哺乳类脊椎动物中发现的性别决定候选基因。Matsuda 等用重组断点法将青鳉的性别决定区定位于 Y 染色体 530 kb 的区段上,随后发现了 1 个性反转 XY 雌性个体,进一步分析将性别决定区缩小到 250 kb 区段,鸟枪法测序得到了 27 个基因,其中 1 个是 Y 染色体特异的,含有 DM 结构域,故命名为 *DMY*^[1]。Shinomiya 等通过大量调查发现野生青鳉种群中大约存在 1% 的性别反转个体,并且检测出他们都携带有突变的 *DMY* 基因,进一步证实了 *DMY* 基因是青鳉的性别决定基因^[2]。但随后的研究发现,一些与青鳉亲缘关系较近的物种及其他硬骨鱼类中均未发现 *DMY* 基因的同源基因,表明它不是鱼类中广泛存在的性别决定基因。

1.2 芳香化酶基因

芳香化酶 (aromatase) 是催化雄激素向雌激素转化的一个关键酶,它能够催化睾酮和雄烯二酮等雄激素转化为雌激素^[3]。在芳香化反应过程中,细胞色素 P450 芳香化酶起主

收稿日期:2013-05-20

基金项目:江苏省水产三项工程项目(编号:PJ2011-1)。

作者简介:单红(1980—),女,江苏南京人,博士,高级工程师,主要从事水生动物遗传育种研究。E-mail:jiangxue0011@sina.com。

[6] 迟淑艳,谭北平,董晓慧,等. 微胶囊蛋氨酸或晶体蛋氨酸对军曹鱼幼鱼相关酶活性的影响[J]. 中国水产科学,2011,18(1):110-118.

[7] 杨志强,曹俊明,赵红霞,等. 饲料添加不同剂型蛋氨酸对凡纳滨对虾生长性能和生化指标的影响[J]. 饲料工业,2011(增):30-33.

[8] Rojas G R, Ronnestad I. Assimilation of dietary free amino acids, peptides and protein in post larval Atlantic halibut (*Hippo-glossus hippoglossus*) [J]. Marine Biology, 2003(142):801-808.

[9] Ronnestad I, Conceição L E, Aragão C, et al. Free amino acids are absorbed faster and assimilated more efficiently than protein in postlarval senegal sole (*Solea senegalensis*) [J]. Journal of Nutrition, 2000, 130(11):2809-2812.

[10] Assimilation R C, Dispensable C O. Indispensable free amino acids

in post-larval senegal sole (*Solea senegalensis*) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 2001(130C):461-466.

[11] Lovell T. Nutrition of aquaculture species [J]. Journal of Animal Science, 1991, 69:4193-4200.

[12] 牛化欣,过世东. 饲料表观消化率及体成分的影响[J]. 海洋科学, 2010, 34(3):15-20.

[13] Chi S Y, Tan B P, Lin H Z, et al. Effects of supplementation of crystalline or coated methionine on growth performance and feed utilization of the pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* [J]. Aquaculture Nutrition, 2011, 17(2):1-9.

[14] 迟淑艳,林黑着,谭北平,等. 低鱼粉饲料中添加微胶囊或晶体蛋氨酸对凡纳滨对虾消化酶活性的影响[J]. 现代农业科技, 2010(11):308-310.

导作用,对调节整个性类固醇激素的平衡有重要意义。Sudhakumari 等详细研究了尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) P450 芳香化酶基因的表达与作用,结果显示 P450 芳香化酶基因在雌雄鱼体中具有明显的表达差异,在卵巢中的表达显著强于在精巢中的表达^[4];在对奥利亚罗非鱼 (*Oreochromis aureus*) 的研究中发现,P450 芳香化酶仅在卵巢中表达,精巢中无表达^[5];青鳉^[6]和欧洲海鲈 (*Dicentrarchus labrax*)^[7] 的 P450 芳香化酶亦在卵巢中表达,精巢中几乎不表达。此外,鱼类体内芳香化酶的表达水平和活性还与雌激素生成量以及生殖细胞发育有关。莫桑比克罗非鱼 (*Tilapia mossambica*) 卵巢合成 17β -雌二醇的能力与芳香化酶 mRNA 水平及蛋白含量密切相关;虹鳟鱼 (*Oncorhynchus mykiss*) 体内促性腺激素的含量随芳香化酶活性的提高而增加;日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*) 血液中 17β -雌二醇的含量与芳香化酶的活性有关,滤泡细胞层分泌 17β -雌二醇的量取决于芳香化酶活性的高低。

1.3 Sox 基因家族

Sox (sry-related box) 基因家族含有 1 个 SRY 样 HMG 盒,广泛参与包括性别决定与性腺分化在内的多个性腺发育事件。其中受到较多重视的是 Sox9 基因,其 HMG 结构域可与 DNA 序列特异性结合,而该区域的突变将会使其失去结合能力从而导致性反转。Northern 杂交分析结果表明,Sox9 在大鳞副泥鳅 (*Paramisgurnus dabryanus*) 精巢中高表达,表明该基因与精巢形成和分化有关。Yokoi 等从青鳉中分离出 Sox9 基因,原位杂交分析发现其主要在成鱼的卵巢中表达,在精巢中表达较少,表明其在性腺分化过程中具有不同的作用方式^[8]。Galay-Burgos 等^[9]和 Hett 等^[10]分别从欧洲海鲈和欧洲大西洋鲟 (*Acipenser sturio*) 中获得 12 个和 8 个 Sox 基因,其中部分存在基因重复现象,这些在鱼类中克隆到的与哺乳动物性别决定基因的同源基因没有保守的性别决定功能,或者其功能有待于进一步验证。

1.4 DMRT 基因家族

DMRT (doublesex and mab-3 related transcription factor) 基因家族是 1 类转录调控因子,含有果蝇的 *doublesex* 基因和线虫 *mab-3* 基因共有的 DM-domain 蛋白序列,其编码的产物以锌指方式与特异的 DNA 序列相结合,调控基因表达^[11]。其中 *Dmrt1* 是一个与性别决定和性腺分化的相关转录因子编码基因,被认为是脊椎动物中最原始的性别相关基因,为继 Sox9 之后发现的又 1 个性别相关的重要基因。Guo 等发现 *DMRT1* 基因在斑马鱼 (*Danio rerio*) 精巢和卵巢发育中都有表达,证明 *DMRT* 基因不仅与其精巢发育密切相关,而且在卵巢发育过程中也起到重要作用^[12]。此外,鱼类中 *DMRT* 基因家族的功能变化很多,其很多成员都有明显的组织特异性,与性别分化有着一定的联系。

2 人工诱导鱼类性别分化

2.1 温度诱导鱼类性别分化

环境因素对性别决定和分化影响的现象已在包括野生型种群和实验种群在内的 39 种硬骨鱼中发现,最主要的因素是温度,其次是种群密度、盐度、pH 值、光周期等。鱼类的温度依赖型性别决定 (temperature-dependent sex-determina-

tion, TSD) 大致可以划分为 3 种类型。第 1 种类型是高温下生成较多的雄性低温则生成较多的雌性,大多数鱼类均属于此种类型。D'cotta 等利用高温处理性别分化期的尼罗罗非鱼,发现升温可使尼罗罗非鱼的芳香化酶 mRNA 表达水平降低,雌二醇分泌量减少,最终使基因型为雌性的个体雄性化^[13]。Desprez 等研究报道,奥利亚罗非鱼的雌雄比率随着温度的变化而变化,在 34 °C 时后代雄性比例高达 97.8 %;在 27 °C 时雌、雄比例趋于平衡,雄性为 63%^[14]。Uchida 等研究发现分别在 28.5、35、37 °C 水温条件下饲养雌性基因型斑马鱼至 40 d,性腺出现雄性化的比率不断上升,分别为 0、68.8% 和 100%^[15]。第 2 种类型则与之相反,高温下为雌性,低温为雄性。Blaquez 等在海鲈鱼中发现其发育处于 15 °C 时雄性占绝对优势,在 24 ~ 25 °C 时,雄性比例下降至 27% 以下;性染色体为 XY 的鲶鱼 (*Ictalurus unctuatus*),在其性别决定的关键时期,高温使群体趋向雌性;大马哈鱼 (*Oncorhynchus nerka*) 在温度升高时群体发育也趋向雌性^[16]。第 3 种类型是高低温均诱导出单性种群,中间温度发育为性比 1:1 的种群。如泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*)^[17] 和大鳞副泥鳅^[18] 在高温 (25 ~ 30 °C) 处理下均能得到明显的偏雄性群体,雄性比率达 80% 以上,而在 20 °C 条件下发育形成性比接近 1:1 的种群;牙鲆 (*paralichthys olivaceus*)^[19] 在升温及降温时,其雌性个体比例减少,中间温度时种群比为 1:1。

2.2 外源激素诱导鱼类性别分化

自 1969 年日本学者 Yamamoto 提出用外源性激素诱导鱼类雄性化和雌性化的设想后,几十年来国内外相继有许多学者在各种不同的鱼类进行了外源类固醇激素诱发性逆转的试验。通过对鱼体进行性激素的处理,使鱼群体由基因型的雄性或雌性转变成为具有功能性的表现型雌性或雄性,常用方法有注射、口服、浸泡和将激素药丸植入鱼体内等。

具有雄性化效应的外源激素如 17α -甲基睾酮 (17α -MT)、 17β -去甲雄三烯醇酮 (TB)、醋酸去甲雄三烯醇酮 (TBA)、11-酮基睾酮 (11-KT)、 11β -羟雄烯二酮 (OHA) 等,它们能够影响鱼类性腺发育过程,改变鱼体个体内源激素表达水平,从而引起鱼类群体性别比率的变化。将性成熟的雄性斑马鱼暴露于不同浓度的 17α -MT 中,发现当浓度达到 6.4 ng/L 和 8.5 ng/L 时即可明显抑制内源酮基睾酮 (KT) 和睾酮 (T) 的表达,62.3 ng/L 的 17α -MT 使 KT 和 T 的表达水平分别降低了 96.6% 和 79.8%^[20]。Sone 等研究发现,雌性食蚊鱼 (*Gambusia affinis*) 幼鱼暴露于 1 μ g/L 和 10 μ g/L TB 中,28 d 后雌鱼体内出现卵精巢结构,卵巢中出现精子^[21]。Arslan 等采用 1 mg/L TBA 处理黑斑刺盖太阳鱼 (*Pomoxis nigromaculatus*) 幼鱼,发现暴露组雄鱼比例为 100%,完全偏离了对照的 1:1 比例;同样, 17β -雌二醇 (E2)、 17α -乙炔基雄二醇 (EE2)、二乙基己烯雌酚 (DES) 等雌激素对鱼类具有雌性化效应,能够诱发鱼类性腺向雌性化方向发育,导致雄鱼发育成为功能性雌鱼^[22]。Wang 等采用含有不同浓度 E2 的饲料分别喂养 30 d 龄大鳍鳞鳃太阳鱼 (*Lepomis macrochirus*) 60 d 后,发现大部分雄性性腺发育为卵巢样结构,其中 150 mg/kg 实验组鱼体雌性化效应最为明显^[23]。Labadie 等^[24] 研究结果表明低浓度 EE2 能够抑制大菱鲆 (*Psetta maxima*) 体内雄烯二酮和 11-KT 的合成,降低其在血浆中的含

量,精巢中出现雌激素的表达。用 10 $\mu\text{g/L}$ DES 处理雄性银鲫 (*Carassius auratus*) 14 d 后,发现鱼体内精母细胞解体,精巢结构明显退化并向卵巢方向发展^[25]。

2.3 芳香化酶抑制剂 (aromatase inhibit, AI) 诱导鱼类性别分化

芳香化酶是将睾酮转化成 17 β -雌二醇的一个关键酶,若将其抑制必然会导致 17 β -雌二醇不能合成,从而使尚未分化的幼鱼由于缺乏雌激素而趋向雄性化。因此,在鱼苗性未分化阶段用芳香化酶抑制剂 (AI) 抑制芳香化酶的作用,可以在一定程度上诱导雄性化个体的产生。Piferer 等在用 AI 处理斑马鱼时,在饲料中添加 AI 浓度为 10 $\mu\text{g/g}$,雄鱼比例达 62.5%;加大 AI 的浓度到 100 $\mu\text{g/g}$ 或 500 $\mu\text{g/g}$ 时,雄鱼率均达到 100%;如果使用 AI 时伴用低剂量的 MT 会达到更好的雄性化效果^[26];但 Bhandari 等发现,外源雌激素会完全阻碍 AI 的作用,抑制其趋向雄性化的可能^[27]。

参考文献:

[1] Matsuda M, Nagahama Y, Shinomiya A, et al. DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish [J]. *Nature*, 2002, 417 (6888): 559-563.

[2] Shinomiya A, Otake H, Togashi K, et al. Field survey of sex-reversals in the medaka, *Oryzias latipes*: genotypic sexing of wild populations [J]. *Zoological Science*, 2004, 21 (6): 613-619.

[3] Conley A J, Corbin C J, Hughes A L. Adaptive evolution of mammalian aromatases: lessons from Suiformes [J]. *Journal of Experimental Zoology Part A - Ecological Genetics and Physiology*, 2009, 311 (5): 346-357.

[4] Sudhakumari C C, Senthilkumaran B, Kobayashi T, et al. Ontogenic expression patterns of several nuclear receptors and cytochrome P450 aromatases in brain and gonads of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* suggests their involvement in sex differentiation [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2005, 31 (2/3): 129-135.

[5] 唐永凯, 李建林, 陈文华, 等. 奥利亚罗非鱼卵巢芳香化酶基因的克隆及其表达 [J]. *中国水产科学*, 2008, 15 (5): 729-737.

[6] Zhou L Y, Wang D S, Shibata Y, et al. Characterization, expression and transcriptional regulation of P450c17 - I and - II in the medaka, *Oryzias latipes* [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, 362 (3): 619-625.

[7] Blazquez M, Gonzalez A, Papadaki M, et al. Sex-related changes in estrogen receptors and aromatase gene expression and enzymatic activity during early development and sex differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2008, 158 (1): 95-101.

[8] Yokoi H, Kobayashi T, Tanaka M, et al. Sox9 in a teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*): evidence for diversified function of Sox9 in gonad differentiation [J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2002, 63 (1): 5-16.

[9] Galay-Burgos M, Llewellyn L, Mylonas C C, et al. Analysis of the Sox gene family in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, 2004, 137 (2): 279-284.

[10] Hett A K, Pitra C, Jenneken I, et al. Characterization of Sox9 in European Atlantic sturgeon (*Acipenser sturio*) [J]. *Journal of Heredity*, 2005, 96 (2): 150-154.

[11] 唐永凯, 王光花, 吴婷婷. 奥利亚罗非鱼 *DMRT1*, *DMO* 基因片段的克隆及序列分析 [J]. *生物技术*, 2006, 16 (2): 1-3.

[12] Guo Y, Cheng H, Huang X, et al. Gene structure, multiple alterna-

tive splicing, and expression in gonads of zebrafish *Dmrt1* [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 330 (3): 950-957.

[13] D'Cotta H, Fostier A, Guiguen Y, et al. Aromatase plays a key role during normal and temperature-induced sex differentiation of tilapia *Oreochromis niloticus* [J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2001, 59 (3): 265-276.

[14] Desprez D, Melard C. Effect of ambient water temperature on sex determination in the blue tilapia *Oreochromis aureus* [J]. *Aquaculture*, 1998, 162 (1/2): 79-84.

[15] Uchida D, Yamashita M, Kitano T, et al. An aromatase inhibitor or high water temperature induce oocyte apoptosis and depletion of p450 aromatase activity in the gonads of genetic female zebrafish during sex-reversal [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2004, 137 (1): 11-20.

[16] Blaquez M, Zanuy S, Carrillo M, et al. Effects of rearing temperature on sex differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) [J]. *Journal of Experimental Zoology*, 1998, 281 (3): 207-216.

[17] Tomoko N, Katsutoshi A, Taiga H, et al. Effect of temperature on sex ratios of normal and gynogenetic diploid loach [J]. *Fisheries Science*, 1998, 64 (5): 753-758.

[18] 南平, 杜启艳, 燕帅国, 等. 温度对泥鳅和大鳞副泥鳅性腺分化的影响和 *CYP19a* 基因的克隆与时空表达 [J]. *中国水产科学*, 2005, 12 (4): 407-413.

[19] Yamamoto E. Studies on sex-manipulation and production of cloned populations in hiramé, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel) [J]. *Aquaculture*, 1999, 173 (1/2/3/4): 235-246.

[20] Andersen L, Goto-Kazeto R, Trant J M, et al. Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2006, 76 (3/4): 343-352.

[21] Sone K, Hinago M, Itamoto M, et al. Effects of an androgenic growth promoter 17 β -trenbolone on masculinization of mosquitofish (*Gambusia affinis*) [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2005, 143 (2): 151-160.

[22] Arslan T, Phelps R P. Production of monosex male black crappie, *Pomoxis nigromaculatus*, populations by multiple androgen immersion [J]. *Aquaculture*, 2004, 234 (1/2/3/4): 561-573.

[23] Wang H P, Gao Z, Beres B, et al. Effects of estradiol-17 β on survival, growth performance, sex reversal and gonadal structure of bluegill sunfish *Lepomis macrochirus* [J]. *Aquaculture*, 2008, 285 (1/2/3/4): 216-223.

[24] Labadie P, Budzinski H. Alteration of steroid hormone profile in juvenile turbot (*Psetta maxima*) as a consequence of short-term exposure to 17 α -ethynylestradiol [J]. *Chemosphere*, 2006, 64 (8): 1274-1286.

[25] Yang L, Lin L, Weng S, et al. Sexually disrupting effects of nonylphenol and diethylstilbestrol on male silver carp (*Carassius auratus*) in aquatic microcosms [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2008, 71 (2): 400-411.

[26] Piferer F, Zanuy S, Carrillo M, et al. Brief treatment with an aromatase inhibitor during sex differentiation causes chromosomally female salmon to develop as normal, functional males [J]. *Journal of Experimental Zoology*, 1994, 270 (3): 255-262.

[27] Bhandari R K, Alam M A, Higa M, et al. Evidence that estrogen regulates the sex change of honeycomb grouper (*Epinephelus merra*), a protogynous hermaphrodite fish [J]. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, 2005, 303 (6): 497-503.