

DOI: 10.12264/JFSC2021-0053

17 α -甲基睾酮对大口黑鲈生长及性腺发育的影响

周家辉^{1,2}, 杜金星², 姜鹏², 邵嘉棋^{2,3}, 白俊杰², 李胜杰²

1. 上海海洋大学, 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306;
2. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 农业农村部热带亚热带水产资源利用与养殖重点实验室, 广东 广州 510380;
3. 河南师范大学水产学院, 河南 新乡 453000

摘要: 为探索建立大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)生理雄鱼诱导技术, 以出膜后 15 d 体长(15.1 $\pm$ 0.09) mm 的大口黑鲈为研究对象, 分别使用含有 17 α -甲基睾酮(MT)的日粮饲喂 60 d。饲料 MT 添加量分别为 0 mg/kg (MT0)、50 mg/kg (MT50)和 100 mg/kg (MT100), 分析其对大口黑鲈生长、性别分化、性类固醇激素含量及性腺发育相关基因表达水平的影响。结果表明, MT50 和 MT100 组大口黑鲈的体长和体重均显著低于 MT0 组($P<0.05$), MT50 和 MT100 组的雄性率均为 100%, 显著高于 MT0 组(45%); 性腺组织切片显示, MT 诱导获得的生理雄鱼性腺结构与 MT0 组雄鱼相似。性类固醇激素测定结果显示, MT50 和 MT100 组生理雄鱼血清中雌二醇的含量均显著低于 MT0 组雌鱼($P<0.05$), MT50 组生理雄鱼睾酮的含量显著高于 MT100 组($P<0.05$), 与 MT0 组雌鱼无显著差异($P<0.05$)。此外, 与 MT0 组雌鱼相比, MT50 和 MT100 组生理雄鱼性腺中 *Dmrt1* 和 *Gsdf* 基因的表达水平显著上调($P<0.05$), 而 *Foxl2* 和 *Cyp19a1a* 基因的表达水平显著下调($P<0.05$)。研究结果表明, MT 添加投喂能有效诱导出膜后 15 d 的雌性大口黑鲈转为生理雄性个体, 适宜添加量为 50~100 mg/kg。本研究为大口黑鲈全雌品种培育奠定了基础。

关键词: 17 α -甲基睾酮; 性逆转; 大口黑鲈; 性类固醇激素; 基因表达

中图分类号: S961

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2021)09-1109-09

大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)又称加州鲈, 隶属于鲈形目(Perciformes), 太阳鱼科(Ceetrachidae), 黑鲈属, 具有肉质鲜美、无肌间刺、生长快和适合集约化养殖等特点, 深受广大消费者和养殖者欢迎。近些年大口黑鲈养殖产量持续攀升, 至 2020 年已达 47.8 万 t^[1], 养殖区域呈现出由南向北、由沿海向内陆发展的趋势。随着水产养殖业的迅速发展, 良种缺乏已成为制约整个水产产业发展的重要因素之一^[2-3]。前期, 本课题组已培育出生长性能优良的新品种大口黑鲈‘优鲈 1 号’(GS01-004-2010)和‘优鲈 3 号’(GS01-001-2018), 推动了大口黑鲈养殖产业的快速发展, 但仍无法充分满足产业规模快速发展对良种的需求。已有

研究表明, 大口黑鲈雌性个体较雄性个体生长更快, 体型更大^[4]。基于此, 使用外源性雄激素将 XX 雌性大口黑鲈逆转为 XX 生理雄鱼, 再与正常的 XX 雌鱼进行配对, 生产全雌大口黑鲈苗种, 或可为开发快长型大口黑鲈新品种提供新的途径^[5]。

17 α -甲基睾酮(17 α -methyl-testosterone, MT)是广泛应用的转雄诱导激素之一, 具有促进和维持雄性器官发育、诱导精子发生和释放的功能^[6]。目前, MT 已经成功诱导了罗非鱼^[7](*Oreochromis* spp.)、黄颡鱼^[8](*Pelteobagrus fulvidraco*)和虹鳟^[9](*Oncorhynchus mykiss*)等多种鱼类发生性逆转, 以此获得的单性群体也已被广泛养殖。研究表明, MT 主要通过影响鱼体的性类固醇激素含量, 如

收稿日期: 2021-02-20; 修订日期: 2021-03-17。

基金项目: 浙江省农业(水产)新品种选育重大科技专项(2016CO2055-3-1); 广州市科技计划项目(202002020018); 中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2021SJ-CG1); 国家淡水水产种质资源库项目(NFGR-2020)。

作者简介: 周家辉(1995-), 男, 硕士研究生, 主要从事水产动物遗传育种研究。E-mail: 1396986217@qq.com

通信作者: 李胜杰, 研究员, 主要从事水产生物技术和水产动物育种研究。E-mail: ssjjli@163.com

雌二醇(estradiol)、睾酮(testosterone)等水平进而诱导雌鱼雄性化^[10]。Sun 等^[11]研究发现,使用芳香化酶抑制剂诱导雌性尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)转雄过程中,实验组雌鱼血清中雌二醇的含量显著低于对照组雌鱼;Chi 等^[12]研究发现,添加 40 mg/kg 的 MT 能够显著提高翘嘴鲌(*Culter alburnus*)血液中睾酮的含量,诱导雌性翘嘴鲌转雄。除此之外,MT 也可通过影响硬骨鱼类性别分化相关基因的表达而促使鱼类发生性逆转。莫媛媛^[13]使用 MT 诱导雌性罗非鱼转雄过程中发现,实验组雌鱼性腺中 *P450arom* 基因的表达水平较对照组雌鱼显著下调,而 *Dmrt1* 基因表达水平则显著上调;闫月明等^[14]使用 MT 诱导食蚊鱼(*Gambusia affinis*) 28 d 后,发现 MT 处理组实验鱼性腺中 *Cyp19a* 基因的表达水平显著低于对照组雌鱼;贾永义^[15]使用 MT 投喂全雌翘嘴鲌 40 d 后,与对照组雌鱼相比,实验组生理雄鱼性腺中 *Foxl2* 和 *Cyp19a* 基因的表达显著下调,而 *Amh* 和 *Dmrt1* 基因的表达显著上调。

目前,已有关于 MT 诱导大口黑鲈转雄的研究报道。Arslan 等^[16]、Garrett^[17]和 Porter^[18]研究发现,在出膜后 21~40 d 使用 50~60 mg/kg 的 MT 诱导,其诱导效果不佳,且有部分鱼苗转雄不完全。因此,本研究以出膜后 15 d 的大口黑鲈为研究对象,通过不同浓度 MT 饲料饲喂,探讨其对大口黑鲈性别分化、性类固醇激素及相关基因表达的影响,从而进一步完善 MT 诱导大口黑鲈转雄的研究,旨在为大口黑鲈单性育种提供技术资料。

1 材料与方法

1.1 实验鱼准备

实验鱼购自广东梁氏水产种业有限公司,挑选健康且相同批次繁殖的大口黑鲈水花鱼苗,放入体积为 7000 L 的圆形水泥池内驯养。期间,每日投喂丰年虫(购自天津丰年虫水产养殖有限公司) 3 次(8:00、12:00、17:00),投喂量约占鱼体重量的 20%。投喂至出膜 10 d 后,开始投喂人工配合饲料(驯食期间和实验期间使用的配合饲料均购自福建天马科技股份有限公司),驯食期间同样每日投喂 3 次,随后每日逐步减少丰年虫投喂量,增

加饲料投喂量,驯化 5 d 后全部摄食人工配合饲料。

1.2 实验饲料配制及饲养过程

实验中所用的 MT 购自美伦生物科技有限公司(广州)。设置 MT 饲料 0 (对照)、50 mg/kg 和 100 mg/kg (以下简称 MT0、MT50 和 MT100) 3 个浓度组。称取一定量的 MT 溶解在 95%的乙醇中,配制成 5 mg/mL 的母液,4 °C 保存备用。配制饲料时使用 95%的乙醇将母液稀释至所用浓度即可。激素饲料参照 El-Greisy 等^[19]采用乙醇喷雾法进行配制,均匀喷洒在饲料上,42 °C 烘干 4 h,对照组饲料使用未添加 MT 的 95%乙醇做同样处理。配制完成后,所有饲料避光干燥保存。

将摄食配合饲料的 1 万尾鱼苗[体长(15.1±0.09) mm、体重(40±0.1) mg]随机分为 3 个实验组,每组 3 个平行,分别置于 9 个网箱(3 m×2 m×1.2 m)内进行激素饲料投喂,每个网箱约 1000 尾。实验期间,每日分别在 8:00、12:00、17:00 饱食投喂 3 次,每次投喂持续约 30 min,以保证饲料被全部摄食,随后清理残饵粪便。水源为经曝气的自来水,实验期间保持水温(27±2) °C、pH 7、光周期为 12 h : 12 h。饲养期为 60 d。

1.3 采样及分析

实验期间每隔 20 d 记录 1 次各组实验鱼的体长和体重数据。饲养实验结束后,禁食 24 h,从每个组随机捞取 24 尾实验鱼(每个网箱 8 尾)。剪取少量鳍条,使用海洋动物基因组 DNA 提取试剂盒(购自天根生化科技有限公司,北京)提取基因组 DNA,利用本课题组已获得的大口黑鲈性别鉴定 SNP 标记(未公开发表),对采集的大口黑鲈遗传性别进行准确鉴定。使用 MS-222 麻醉后通过尾部静脉采集血液,静置 4 h,3000 g 离心 20 min,吸上清-80 °C 保存备用。随后解剖取出性腺,通过性腺形态学判定雌雄性别,然后使用生理盐水将取出的性腺冲洗干净,将其中一半迅速放入液氮中冷冻,而后转入-80 °C 保存备用,用于提取总 RNA。另一半放入 4%的多聚甲醛(购自武汉塞维尔生物科技有限公司)中固定 24 h,然后更换 70%的乙醇备用,用于制作组织切片。

1.3.1 组织切片 性腺组织样品经梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋后连续切片(厚度

5~8 μm), 每条鱼的性腺至少横切 3 个不同的截面, 切片经苏木精-伊红(HE)染色后, 使用 Leica DM2500 显微镜观察并拍照, 并参照 Rhody 等^[20]的方法确定其表型性别。

1.3.2 血清雌二醇和睾酮含量测定 从采集的样品中挑选出实验组生理雄鱼以及对照组雌鱼的血清(每个网箱随机挑选 3 尾)进行雌二醇和睾酮含量测定。雌二醇和睾酮的含量测定采用酶联免疫法进行, 试剂盒购自南京建成生物科技有限公司, 按照说明书进行测定。

1.3.3 RNA 样品提取及基因表达分析 从采集的 RNA 样品中挑选出实验组生理雄鱼和对照组雌鱼各 6 尾(每个网箱 2 尾)。使用 Trizol (购自广州威佳科技有限公司)法提取性腺总 RNA, 提取的 RNA 样品经 1%琼脂糖凝胶电泳检测质量, 而后使用酶标仪(Biotek Cytation 5)检测其浓度。

根据试剂盒说明书, 使用 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser 商业试剂盒 (TaKaRa)将 1 μg 总 RNA 反转成 cDNA。反转录体系为 20 μL, 反应条件为 42 ℃ 2 min, 37 ℃ 15 min, 85 ℃ 5 s。cDNA 稀释至 10% 后, 使用 SYBR[®]Green real-time PCR Mater Mix plus (TaKaRa) 和 Bio-Rad CFX96 触控检测系统进行 Real-time PCR。Real-time PCR 反应体系(20 μL)包括: 2 μL cDNA, 10 μL SYBR, 7.2 μL ddH₂O, 0.4 μL 正向和反向引物。反应条件为: 95 ℃ 预变性 2 min; 然后 95 ℃ 变性 10 s, 60 ℃ 退火 10 s; 72 ℃ 延伸 10 s, 循环 40 次, 最后 72 ℃ 延伸 10 min。以 β-actin 为内参基因^[21], 采用 2^{-ΔΔC_t} 计算结果, 并表示为相对于 β-actin 的表达水平^[22]。本研究中使用的所有引物均委托广州艾基生物技术有限公司合成, 引物见表 1。

表 1 荧光定量引物序列
Tab. 1 Nucleotide sequences of real-time PCR primers

基因 gene	基因序列号 GenBank no.	正向引物 forward primer	反向引物 reverse primer
<i>Foxl2</i>	ACD62374.1	5'-CACTCGACCCAGCCTGTGAG-3'	5'-GCCGTCTCCTCCGAACAAGG-3'
<i>Cyp19a1a</i>	ABL64075.1	5'-GTGAGGCAGTGTGTGCTGGA-3'	5'-CAGCCGCAGCTCCACATCT-3'
<i>Dmrt1</i>	CAQ52797.1	5'-GCTCCCGCTGTAGGAACCAC-3'	5'-CCTGAGCCTGCTGCCTTCTC-3'
<i>Gsdf</i>	120545463	5'-AGCAATGCCACAGAGCCAT-3'	5'-GGCTGGCAGGATGGATCACC-3'
<i>β-actin</i>	XM020651307.1	5'-AAAGGGAAATCGTGCGTGAC-3'	5'-AAGGAAGGCTGGAAGAGGG-3'

1.4 数据统计

所有数据均以平均值±标准差($\bar{x} \pm SD$)表示, 结果用 SPSS19.0 软件进行单因素方差分析, Duncan's 多重比较分析组间差异, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 日粮中添加不同浓度 MT 对大口黑鲈生长的影响

使用不同浓度的 MT 投喂大口黑鲈 60 d 后, 实验鱼体长和体重变化如图 1。结果显示, 从投喂

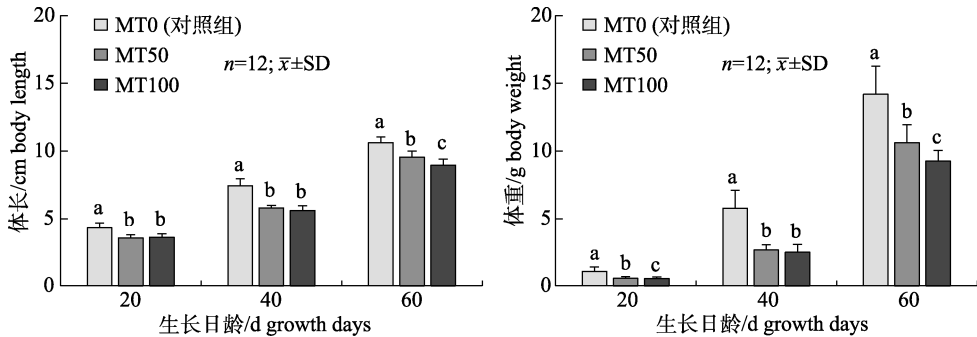


图 1 日粮中添加不同浓度 MT 对大口黑鲈全长和体重的影响

相同日龄各组间字母不同表示组间差异显著($P < 0.05$).

Fig. 1 Effects of different concentrations of MT supplementation on the body length and weight of *Micropterus salmoides*. Different letters between the treatments in the same period show significant difference ($P < 0.05$).

第 20 天至 60 天结束, 实验组实验鱼的体长和体重均显著低于 MT0 组($P<0.05$)。投喂第 20~40 天时, MT50 组和 MT100 组实验鱼的体长和体重均无显著差异($P>0.05$)。随着投喂时间延长至 60 d 时, MT100 组实验鱼的体长和体重显著低于 MT50 组($P<0.05$)。

2.2 性别比和性腺组织学

性腺形态学以及组织学性别鉴定结果见表 2。结果显示, MT0 组的雄性比例为 45%, MT50 和 MT100 组均为 100%。性腺组织切片显示(图 2), 实验组遗传雌鱼的性腺已经完全发育为精巢, 且精巢结构与对照组的雄鱼相似。MT0 组雄鱼性腺

中分布着大量的精母细胞, 而实验组生理雄鱼性腺中以精原细胞和间质组织为主, 精母细胞较少, 在精巢中央形成了一个中空的精小叶。

表 2 日粮中添加不同浓度 MT 对大口黑鲈性别比的影响
Tab. 2 Effects of different concentrations of MT supplementation on the sex ratio in *Micropterus salmoides*
 $n=24$; %

组别 group	形态学 morphology		组织学 histology	
	雌性 female	雄性 male	雌性 female	雄性 male
MT0	55	45	55	45
MT50	—	100	—	100
MT100	—	100	—	100

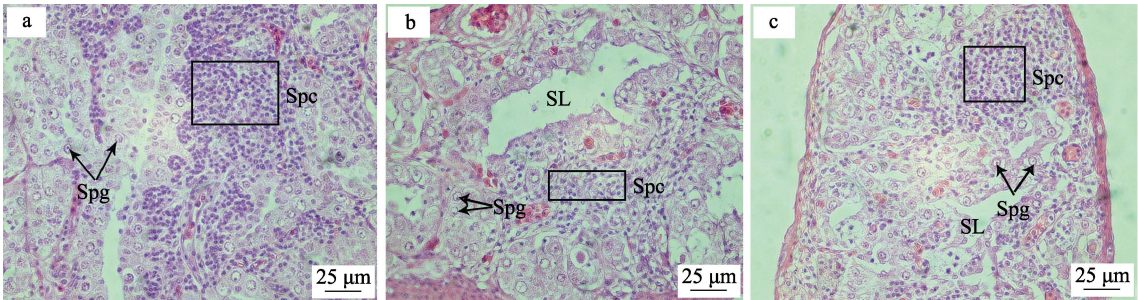


图 2 日粮中添加不同浓度 MT 对大口黑鲈性腺结构的影响

a. MT0 组雄鱼; b. MT50 组生理雄鱼; c. MT100 组生理雄鱼. Spc: 精母细胞; Spg: 精原细胞; SL: 精小叶.

Fig. 2 Effects of different concentrations of MT supplementation on the structures of gonads in *Micropterus salmoides*
a. Male in MT0 group; b. Physiological males in MT50 group; c. Physiological males in MT100 group.
Spc: spermatocyte; Spg: spermatogonia; SL: seminiferous lobule.

2.3 血清中雌二醇和睾酮含量变化

血清中雌二醇和睾酮的含量变化如图 3 所示。雌二醇测定显示, MT50 和 MT100 组生理雄鱼雌二醇的

含量显著低于对照组雌鱼($P<0.05$)。睾酮含量测定显示, MT50 组生理雄鱼睾酮含量显著高于 MT100 组($P<0.05$), 但均与对照组雌鱼无显著差异($P>0.05$)。

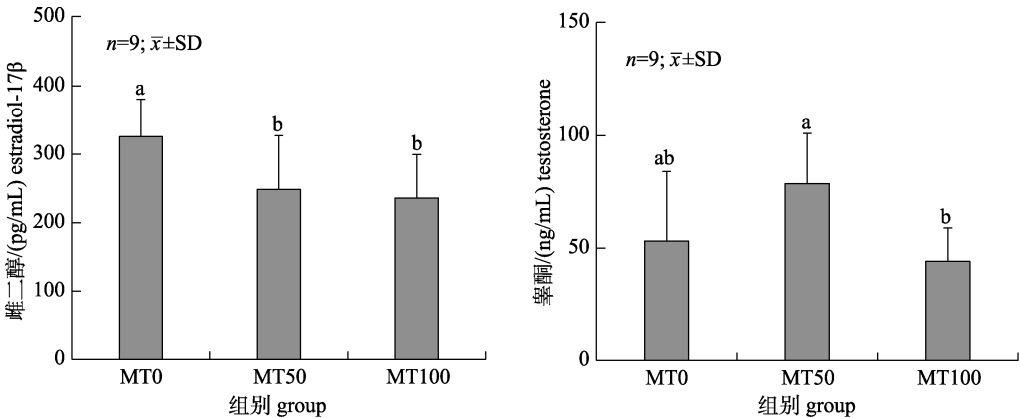


图 3 日粮中添加不同浓度 MT 对大口黑鲈血清中雌二醇和睾酮含量的影响
不同字母表示组间差异显著($P<0.05$)。

Fig. 3 Effects of different concentrations of MT supplementation on the serum content of estradiol and testosterone in *Micropterus salmoides*
Different letters indicate significant differences between groups ($P<0.05$).

2.4 性别分化相关基因的表达变化

投喂 MT 后, 与对照组鱼相比, MT50 和 MT100 组生理雄鱼性腺中与精巢发育和分化相关

基因 *Dmrt1* 和 *Gsdf* 的表达水平显著上调, 而与卵巢发育和分化相关基因 *Foxl2* 和 *Cyp19a1a* 的表达水平则显著下调(图 4)。

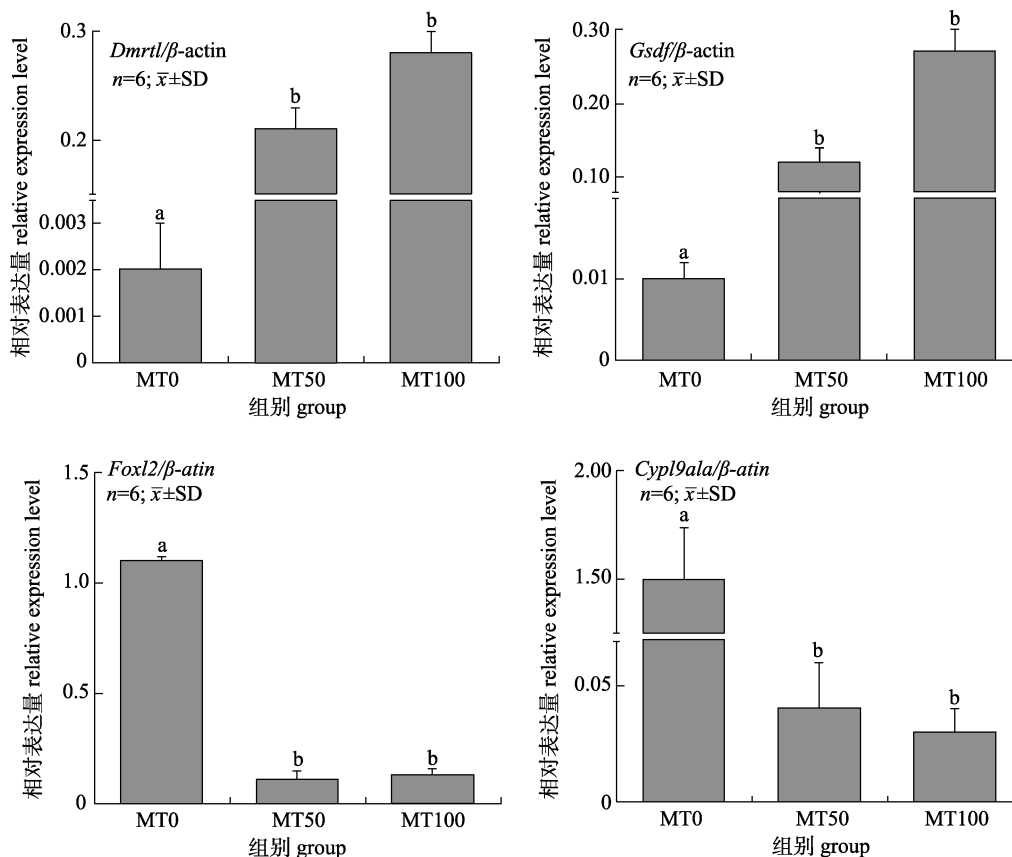


图 4 日粮中添加不同浓度的 MT 对性别分化相关基因表达的影响

不同字母表示组间差异显著($P < 0.05$)。

Fig. 4 Effects of different concentrations of MT supplementation on the gene expression in *Micropterus salmoides*. Different letters indicates significant differences between groups ($P < 0.05$).

3 讨论

3.1 日粮中添加 MT 对大口黑鲈生长的影响

MT 作为一种高效的性逆转诱导激素, 除了对性别分化产生影响外, 对鱼类的生长同样具有显著的影响。研究表明, 低剂量的 MT 对鱼类的生长具有促进作用, 而高剂量的 MT 则会产生抑制作用^[23]。在黄姑鱼中 MT 添加剂量高于 0.2 mg/L 时会抑制实验鱼生长, 低于 0.2 mg/L 则无显著影响^[24]; 而在樱桃鲃(*Barbus titteya*)中的研究结果相反, 日粮中添加 100 mg/kg 的 MT 能够促进其生长^[25]。上述研究表明, 对于不同鱼类, MT 对生长产生促进和抑制作用的浓度差异很大。在本研究中, 使用 50 mg/kg 和 100 mg/kg 的 MT 添加投喂

后, 两个实验组大口黑鲈的体长和体重均显著低于对照组。这与稀有鮡鲫(*Gobiocypris rarus*)和食蚊鱼中的研究结果相似^[26-27]。另外本研究发现, MT 添加投喂 40 d 内, 50 mg/kg 组和 100 mg/kg 组的体长和体重无显著差异($P > 0.05$), 至 60 d 时, 100 mg/kg 组的体长和体重显著低于 50 mg/kg 组($P < 0.05$)。表明投喂时间越长, 高浓度的 MT 添加投喂对大口黑鲈的生长抑制作用越显著。

3.2 日粮中添加 MT 对大口黑鲈性别比和性腺结构的影响

研究表明, 激素诱导的浓度、激素诱导开始时间以及诱导持续时间是成功控制鱼类性别的 3 个关键因素^[28]。Arslan 等^[16]对出膜后 40 d (体长

33.5 mm)的大口黑鲈幼苗分别进行了持续 30 d、45 d 和 60 d 添加 60 mg/kg MT 的投喂实验, 结果分别获得了 49.0%、48.9%和 52.4%的雄性率, 表明诱导持续时间对大口黑鲈性别比可能没有影响。与之相比, Garrett^[17]使用相似浓度(50 mg/kg)的 MT 投喂出膜 35 d (体长 20~30 mm)的大口黑鲈幼苗持续 60 d, 结果获得了 90%雄性率; 同样地, Porter^[18]使用添加 50 mg/kg MT 的饲料对出膜 21~28 d (体长 15~25 mm)的大口黑鲈幼苗进行持续 70 d 的投喂后, 最高获得了 95%的雄性率。这些研究表明激素诱导开始时间是影响大口黑鲈性别比的关键因素之一。另外, 本课题组在前期的研究中对大口黑鲈早期性腺发育进行了组织切片及基因表达研究(另文发表)。结果显示, 原始性腺在出膜后 12 d 首次出现; 同时, 卵巢发育相关的基因在出膜后 20 d 出现高表达。故推断雌性大口黑鲈性别分化的关键时间可能在出膜后 20 d 之前。在本研究中, 使用的激素浓度及诱导持续时间与上述研究相似, 但激素诱导开始时间更早[出膜后 15 d, 体长(15.1±0.09) mm], 结果两个实验组均获得了100%的雄性率, 并且不存在性逆转不完全的大口黑鲈。由此可见, 大口黑鲈最佳的激素诱导时间在出膜后 20 d 之前, 在此阶段进行激素诱导可以获得更好的性转化率。

鱼类早期性别分化难以从表观形态学进行区分, 其内部性腺组织的形态特征变化如卵巢腔和输精管的形成等可作为鱼类早期性别分化的标志^[29]。在本研究中, 通过性腺组织学观察显示, 实验组生理雄鱼的精巢结构与对照组的雄鱼相似, 但实验组生理雄鱼的精巢中以精原细胞和间质组织为主, 精母细胞较少, 且在精巢中央形成了一个中空的精小叶, 这种现象在黄鳝(*Monopterus albus*)中也有类似的报道^[30], 推测出现这种现象可能的原因是使用 MT 剂量过高, 超过了大口黑鲈性腺承受范围造成的结构异常^[31]。

3.3 投喂 MT 对性类固醇激素及性别相关基因表达的影响

雌二醇和睾酮作为最主要及活性最强的内源性雌性和雄性激素, 主要参与卵巢和精巢分化、卵母细胞和精子成熟等过程。已有研究表明, 抑

制雌二醇的合成是大多数鱼类雌性个体雄性化的必要条件, 如在罗非鱼^[32]、石斑鱼^[33](*Epinephelus* ssp)等鱼类雌性个体向雄性转化的过程中, 实验组雌鱼中雌二醇的含量均低于对照组雌鱼。在本研究中, 添加 MT 后, 实验组生理雄鱼血清中雌二醇的含量显著低于对照组雌鱼, 表明抑制雌二醇的分泌是诱导大口黑鲈雌性个体雄性化的必要因素^[34]。姚汶励等^[35]使用 50 mg/kg、100 mg/kg 和 200 mg/kg 的 MT 诱导雌性草鱼 45 d, 结果显示随着 MT 浓度的升高, 睾酮含量降低。同样在本研究中, 随着 MT 浓度升高, MT100 组血清中睾酮的含量显著低于 MT50 组。在雌性鲮(*Mugil cephalus*)^[36]和雌性日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)^[37]中也观察到类似现象。推测出现这种现象可能是鱼体出现了负反馈调节作用, 抑制高浓度组睾酮的合成^[38]。

Real-time PCR 结果表明, 与对照组雌鱼相比, 实验组生理雄鱼显著上调了 *Dmrt1* 和 *Gsdf* 的表达水平。相反地, 实验组生理雄鱼 *Foxl2* 和 *Cyp19a1a* 基因的表达水平显著低于对照组雌鱼, 这与食蚊鱼^[27]、翘嘴鲌^[18]以及泰国斗鱼(*Betta splendens*)^[39]等的研究结果类似。雌二醇含量减少以及卵巢发育相关基因表达水平的下调, 会抑制卵巢发育, 而精巢发育相关基因表达的上调, 则会启动精巢的发育, 进而导致了性逆转的发生^[40]。由此可见, MT 可能通过影响性腺发育相关激素水平及相关基因表达的丰度进而导致大口黑鲈发生性逆转。

综上所述, 本研究用含有 50 mg/kg 和 100 mg/kg 17 α -甲基睾酮的饲料投喂出膜后 15 d 的大口黑鲈 60 d, 均获得 100%的雄性率。MT 通过降低雌二醇含量、下调 *Foxl2* 和 *Cyp19a1a* 基因表达水平和上调 *Dmrt1* 和 *Gsdf* 基因表达水平来促使大口黑鲈发生性逆转。然而, 本研究中诱导获得的生理雄鱼性腺结构异于正常雄鱼, 关于生理雄鱼能否进一步发育成熟及繁殖还需要进一步研究。本研究建立了一种大口黑鲈生理雄鱼诱导技术, 为大口黑鲈单性品种培育奠定了基础。

参考文献:

- [1] Bureau of Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society

- of Fisheries. 2020 China Fishery Statistical Yearbook[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2020. [农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2020 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2020.]
- [2] Gui J F. Status and future of genetic and developmental basic research on fish variety improvement[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2005, 17(2): 112-118. [桂建芳. 鱼类品种改良的遗传和发育基础研究的现状和将来[J]. 生命科学, 2005, 17(2): 112-118.]
- [3] Liang X F, Wang H P. Innovation and Industrialization of *Siniperca chuatsi* Culture in the World[M]. Beijing: Science Press, 2018. [梁旭方, 王汉平. 世界鳊鲈养殖创新与产业化[M]. 北京: 科学出版社, 2018.]
- [4] Arslan T. Sex determination in selected centrarchids[D]. Auburn: Auburn University, 2002.
- [5] Yang T Y, Xiong Y, Dan C, et al. Production of XX male yellow catfish by sex-reversal technology[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2018, 42(5): 871-878. [杨天毅, 熊阳, 丹成, 等. 利用鱼类性逆转技术创制黄颡鱼 XX 雄鱼的方法[J]. 水生生物学报, 2018, 42(5): 871-878.]
- [6] Du C B. Advance of research on fishes sex control in China[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2000, 13(1): 74-80. [杜长斌. 我国鱼类性别控制研究进展[J]. 水产学杂志, 2000, 13(1): 74-80.]
- [7] Qian H, Yang W. Experimental study on androgenesis of tilapia induced by hormone[J]. Freshwater Fisheries, 1993, 23(4): 41-42. [钱晖, 杨文. 激素诱导罗非鱼雄性化的试验研究[J]. 淡水渔业, 1993, 23(4): 41-42.]
- [8] Yao D X. Sex differentiation and hormonal sex reversal of *Pelteobagrus fulvidraco*[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2007. [姚道霞. 黄颡鱼性分化及激素诱导性转化研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2007.]
- [9] Zhao W X, Tan Y Q, Peng S B. Sex reversal induced with 17 α -methyltestosterone in rainbow trout[J]. Freshwater Fisheries, 1991, 21(1): 3-5. [赵维信, 谈毅奇, 彭士兵. 17 α -甲基睾酮诱导虹鳟性转化[J]. 淡水渔业, 1991, 21(1): 3-5.]
- [10] Arslan T. Sex-determining mechanisms and control of sex differentiation in largemouth bass and crappies[M]//Sex Control in Aquaculture. Chichester: John Wiley & Sons, 2018: 385-403.
- [11] Sun L N, Jiang X L, Xie Q P, et al. Transdifferentiation of differentiated ovary into functional testis by long-term treatment of aromatase inhibitor in Nile tilapia[J]. Endocrinology, 2014, 155(4): 1476-1488.
- [12] Chi M L, Jia Y Y, Cheng S, et al. Effects of 17 α -methyltestosterone on the growth performance, development, and reproduction of gynogenetic topmouth *Culter alburnus* Basilewsky[J]. Journal of Applied Ichthyology, 2019, 35(2): 444-456.
- [13] Mo Y Y. Influence of 17 α -methyltestosterone and Letrozole on sex reversal and mechanism for sex determination in Nile tilapia[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2010. [莫媛媛. 17 α -methyltestosterone 和 letrozole 对尼罗罗非鱼性转化影响及其性别决定机制的初步研究[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2010.]
- [14] Yan Y M, Fang Z Q. Mrna expression of *CYP19a* gene induced by 17 β -estradiol and 17 α -methyltestosterone in mosquitofish (*Gambusia affinis*)[J]. Journal of Jinggangshan University (Natural Science), 2016, 37(4): 30-36. [闫月明, 方展强. 雌二醇和甲基睾酮暴露对食蚊鱼 *CYP19a* 表达的影响[J]. 井冈山大学学报(自然科学版), 2016, 37(4): 30-36.]
- [15] Jia Y Y. Topmouth culter (*Culter alburnus*) all-female breeding system establishment and evaluation[D]. Shanghai: East China Normal University, 2019. [贾永义. 翘嘴鲌 (*Culter alburnus*) 全雌育种体系建立与评价[D]. 上海: 华东师范大学, 2019.]
- [16] Arslan T, Phelps R P, Osborne J A. Effects of oestradiol-17 β or 17 α -methyltestosterone administration on gonadal differentiation of largemouth bass *Micropterus salmoides* (Lacepède)[J]. Aquaculture Research, 2009, 40(16): 1813-1822.
- [17] Garrett G P. Hormonal sex control of largemouth bass[J]. The Progressive Fish-Culturist, 1989, 51(3): 146-148.
- [18] Porter M D. Effects of methyltestosterone on largemouth bass, *Micropterus salmoides*[J]. Journal of Applied Aquaculture, 1996, 6(4): 39-45.
- [19] El-Greisy Z A, El-Gamal A E. Monosex production of tilapia, *Oreochromis niloticus* using different doses of 17 α -methyltestosterone with respect to the degree of sex stability after one year of treatment[J]. The Egyptian Journal of Aquatic Research, 2012, 38(1): 59-66.
- [20] Rhody N R, Neidig C L, Grier H J, et al. Assessing reproductive condition in captive and wild common snook stocks: A comparison between the wet mount technique and histological preparations[J]. Transactions of the American Fisheries Society, 2013, 142(4): 979-988.
- [21] Yang S, Yan T, Wu H, et al. Acute hypoxic stress: Effect on blood parameters, antioxidant enzymes, and expression of HIF-1 α and GLUT-1 genes in largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2017, 67: 449-458.
- [22] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta C_T$} method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [23] Rinchar J, Dabrowski K, Garcia-Abiado M A, et al. Uptake and depletion of plasma 17 α -methyltestosterone during ind-

- uction of masculinization in muskellunge, *Esox masquinongy*: Effect on plasma steroids and sex reversal[J]. Steroids, 1999, 64(8): 518-525.
- [24] Yang F. Effect of 17 α -methyltestosterone and letrozole on the sex differentiation in two croakers[D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2017. [阳芳. 17 α -甲基睾酮和芳香化酶抑制剂来曲唑对两种黄姑鱼性腺分化的影响[D]. 舟山: 浙江海洋大学, 2017.]
- [25] Yu X. The effects of astaxanthin and methytransferase on the growth and body color of cherry barb[D]. Xi'an: Northwest University, 2012. [喻翔. 虾青素与甲基睾酮对樱桃鲃生长与体色的影响[D]. 西安: 西北大学, 2012.]
- [26] Liu A P, Zha J M, Wang Z J, et al. Influences of 17 α -methyltestosterone on gonad development and plasma vitellogenine induction of rare minnow larva[J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2006, 1(3): 254-258. [刘阿朋, 查金苗, 王子健, 等. 17 α -甲基睾酮对稀有鮡鲫幼鱼性腺发育与血清卵黄蛋白原水平的影响[J]. 生态毒理学报, 2006, 1(3): 254-258.]
- [27] Fan J J, Xu S Q, Fang Z Q, et al. Target gene expression and morphological masculinization in mosquitofish (*Gambusia affinis*) exposed to 17 α -methyltestosterone[J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(1): 9-15. [范俊杰, 徐少群, 方展强, 等. 17 α -甲基睾酮对食蚊鱼形态雄性化及目标基因表达的影响[J]. 水产学报, 2013, 37(1): 9-15.]
- [28] Piferrer F. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish[J]. Aquaculture, 2001, 197(1-4): 229-281.
- [29] Liu C B, Xu G F, Huang T Q, et al. A review of research progress on gonadal development in fish[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2019, 32(1): 46-54. [刘晨斌, 徐革锋, 黄天晴, 等. 鱼类性腺发育研究进展[J]. 水产学杂志, 2019, 32(1): 46-54.]
- [30] Zhuo X L, Zou J X, Cui K, et al. The influence of exogenous methyltestosterone on the gonad developmental process of female and intersexual *Monopterus albus*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2008, 32(6): 861-867. [卓孝磊, 邹记兴, 崔科, 等. 外源性甲基睾酮对雌性和间性黄鳝性腺发育的影响[J]. 水生生物学报, 2008, 32(6): 861-867.]
- [31] Sarter K, Papadaki M, Zanuy S, et al. Permanent sex inversion in 1-year-old juveniles of the protogynous dusky grouper (*Epinephelus marginatus*) using controlled-release 17 α -methyltestosterone implants[J]. Aquaculture, 2006, 256(1-4): 443-456.
- [32] Paul-Prasanth B, Bhandari R K, Kobayashi T, et al. Estrogen oversees the maintenance of the female genetic program in terminally differentiated gonochorists[J]. Scientific Reports, 2013, 3: 2862.
- [33] Wang Q, Huang M W, Peng C, et al. MT-feeding-induced impermanent sex reversal in the orange-spotted grouper during sex differentiation[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(9): 2828.
- [34] Bhandari R K, Higa M, Nakamura S, et al. Aromatase inhibitor induces complete sex change in the protogynous honeycomb grouper (*Epinephelus merra*)[J]. Molecular Reproduction and Development, 2004, 67(3): 303-307.
- [35] Yao W L, Jiang P, Bai J J. Effects of 17 α -methyltestosterone on gonadal development and hormone levels in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2019, 43(4): 801-809. [姚汶励, 姜鹏, 白俊杰. 17 α -甲基睾酮对草鱼性腺发育及性类固醇激素水平的影响[J]. 水产学报, 2019, 43(4): 801-809.]
- [36] Tamaru C S, Kelley C D, Lee C S, et al. Effects of chronic LHRH-a + 17-methyltestosterone or LHRH-a + testosterone therapy on oocyte growth in the striped mullet (*Mugil cephalus*)[J]. General and Comparative Endocrinology, 1989, 76(1): 114-127.
- [37] Zhang L H, Zhang W M, Lin H R. Effects of 4-androstene-3, 17-dione and 17 α -methyl testosterone on testosterone and 17 β -estradiol levels in the serum of *Anguilla japonica*[J]. Journal of Fisheries of China, 2001, 25(2): 107-111. [张利红, 张为民, 林浩然. 雄烯二酮和甲基睾酮对日本鳗鲡血清睾酮和 17 β -雌二醇含量的影响[J]. 水产学报, 2001, 25(2): 107-111.]
- [38] Zhou L B, Liu X C, Ye W, et al. *In vitro* studies of effects of 17 β -estradiol and methyl-testosterone on gonadotropin secretion by pituitary of helmet catfish (*Cranoglanis boudierius*)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2005, 12(2): 113-118. [周立斌, 刘晓春, 叶卫, 等. 17 β -雌二醇和甲基睾酮对离体长臀鮠脑垂体促性腺激素分泌的影响[J]. 中国水产科学, 2005, 12(2): 113-118.]
- [39] Yuan J Y, He C, Hong G, et al. Masculinization of Thailand *Betta* (*Betta splendens*) with androgen treatment[J]. Journal of Hainan Tropical Ocean University, 2018, 25(2): 13-19. [袁洁怡, 贺超, 洪广, 等. 雄激素诱导泰国斗鱼雄性化研究[J]. 海南热带海洋学院学报, 2018, 25(2): 13-19.]
- [40] Rougeot C, Krim A, Mandiki S N M, et al. Sex steroid dynamics during embryogenesis and sexual differentiation in Eurasian perch, *Perca fluviatilis*[J]. Theriogenology, 2007, 67(5): 1046-1052.

Effects of 17 α -methyltestosterone on growth and sex differentiation in largemouth bass (*Micropterus salmoides*)

ZHOU Jiahui^{1,2}, DU Jinxing², JIANG Peng², SHAO Jiaqi^{2,3}, BAI Juejie², LI Shengjie²

1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Tropical and Subtropical Fishery Resource Application and Cultivation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangzhou 510380, China;
3. Fisheries College, Henan Normal University, Xinxiang 453000, China

Abstract: In order to breed the all-female largemouth bass (*Micropterus salmoides*) population, 15-day old largemouth bass, with an average length of (15.1 $\pm$ 0.09) mm, were fed dietary supplements containing 0 (MT0), 50 (MT50), and 100 mg/kg (MT100) 17 α -methyltestosterone (MT). After continuous feeding for 60 days, the effects of MT on the growth, sex differentiation, hormone levels, and gene expression variations in largemouth bass were analyzed. The body lengths and weights of largemouth bass in the MT50 and MT100 groups were significantly lower than those in the MT0 group ($P<0.05$). The male sex ratio in both MT50 and MT100 groups was 100%, which was significantly higher than that in the MT0 group (45%) ($P<0.05$). Histological sections of the gonads indicated that the gonadal structures of MT-induced physiological males were similar to those of wild-type males. The concentration of estradiol in the physiological males of the MT50 and MT100 groups was significantly lower than that in the wild-type females of MT0 group ($P<0.05$), while the concentration of testosterone in physiological males of the MT50 group was significantly higher than that in the females of MT100 and MT0 groups ($P<0.05$). Additionally, compared to the wild-type females, the expressions of *Dmrt1* and *Gsdf* were upregulated, while the expressions of *Foxl2* and *Cyp19a1a* were downregulated in the gonads of physiological males in the MT50 and MT100 groups. In conclusion, dietary supplementations of 50~100 mg/kg MT could effectively induce the 15-day-old female largemouth bass sex-reversal into physiological males. This study establishes a physiological male induction method and provides valuable information for the breeding of all-female largemouth bass population.

Key words: 17 α -methyltestosterone; sex induction; largemouth bass; sex steroid hormone; gene expression

Corresponding author: LI Shengjie. E-mail: ssjli@163.com