

DOI: 10.12264/JFSC2024-0299

人工繁育红九棘鲈性腺发育规律与特征

王崇伟^{1,2}, 李雪¹, 李超伟^{1,2}, 卢昇¹, 宋煜¹, 刘洋¹, 陈松林¹

1. 海水养殖生物育种与可持续产出全国重点实验室, 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;
2. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510006

摘要: 为探究人工繁育条件下红九棘鲈(*Cephalopholis sonnerati*)早期性腺发育、分化规律及其繁育特性, 本研究通过解剖和组织学技术, 追踪观察了 30~660 日龄红九棘鲈的性腺。研究结果表明, 红九棘鲈为典型的雌雄同体、雌性先熟鱼种, 其卵巢异步成熟, 多次产卵。卵母细胞可分为 6 个时相, 根据不同时相卵母细胞组成可将卵巢发育分为 6 个时期。早期性腺发育在 45 日龄开始出现原始卵巢腔, 150 日龄卵原细胞开始大量增殖, 270 日龄为 II 期卵巢, 310 日龄为 III 期卵巢, 660 日龄为 IV 期卵巢。人工繁育条件下红九棘鲈在 380 日龄未初次性成熟就可以开始性逆转。本研究首次报道了人工繁育红九棘鲈性腺发育规律和分化特征, 为红九棘鲈苗种规模化繁育和良种选育奠定理论基础。

关键词: 红九棘鲈; 性腺发育; 性腺分化; 性逆转

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2025)01-0024-11

石斑鱼是我国重要的海水养殖鱼类, 涵盖 16 个属的 160 多种, 其中在东亚和东南亚地区主要养殖的石斑鱼约有 47 种^[1-2]。石斑鱼类是珊瑚礁生态系统中一种重要的海洋鱼类, 具有寿命长、生长缓慢、性成熟周期长等特点^[3]。红九棘鲈隶属于鲈形目鮨科九棘鲈属, 有“红瓜子斑”、“过鱼”、“网纹鲈”等俗称, 主要分布于印度洋-太平洋的热带和亚热带海域, 在我国主要见于南海诸岛、海南岛和澎湖列岛^[4-6]。

红九棘鲈体色鲜红, 肉质细嫩, 味道鲜美, 深受消费者的喜爱, 市场价格高于红东星斑。作为一种重要的名贵石斑鱼类, 红九棘鲈的市场需求量很大。但红九棘鲈的人工繁育迟迟未能突破, 迄今尚没有人工养殖的商品鱼供应市场, 只能依赖捕捞野生红九棘鲈成鱼供应市场, 难以满足日益增长的市场需求。因此, 攻克红九棘鲈人工繁

育技术, 培育人工繁育苗种, 开发成鱼人工养殖技术成为石斑鱼养殖业中亟待攻关的难题。石斑鱼是一种典型的雌雄同体、雌性先熟的鱼类, 群体中只有少数个体在性成熟后会发生性逆转, 转变为雄性^[7]。其雌雄亲鱼不能同步成熟、雄性亲鱼数量较少成为制约红九棘鲈生产工作的主要问题。石斑鱼性腺发育的研究早有报道, 赵会宏等^[8]研究了斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)卵巢的发育过程; 邱弈树等^[9]研究了金虎杂交斑(*Epinephelus fuscoguttatus*♀×*Epinephelus tukula*♂)和棕点石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus*)的性腺发育和性激素相关类固醇激素的变化; 李子奇等^[10]研究了云纹石斑鱼和云龙杂交斑(*Epinephelus moara*♀×*Epinephelus lanceolatus*♂)性腺的周期发育。关于红九棘鲈性腺发育完整过程的组织学观察迄今未见报道。红九棘鲈作为新兴的石斑鱼养殖对象, 许多基础

收稿日期: 2024-09-18; 修订日期: 2024-10-09.

基金项目: 农业生物育种重大项目(2023ZD0405502); 山东省重点研发计划项目(2023ZLYS02); 山东省泰山学者攀登计划专项; 海南省院士创新平台项目(YSPTZX202402).

作者简介: 王崇伟(1997-), 男, 博士研究生, 主要从事水产遗传育种研究. E-mail: wangchw4842@foxmail.com

通信作者: 陈松林, 研究员, 主要从事鱼类基因组与遗传育种研究. E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

研究仍处于空白阶段, 仅在基因组测序和转录组分析^[11]以及寄生虫鉴定与病害研究^[12-13]方面有相关报道。2023 年, 中国水产科学研究院黄海水产研究所与万宁林兰公司合作, 突破了红九棘鲈苗种人工繁育技术, 培育出 2 万尾鱼苗, 为红九棘鲈性腺发育研究提供了可能。本研究以上述苗种为材料, 采用解剖学和组织学方法, 首次对人工繁育的红九棘鲈苗种及成鱼开展了为期 22 个月的追踪观察, 探讨了红九棘鲈早期性腺发育规律与性逆转机制, 发现了红九棘鲈性腺发育的一些特殊之处, 旨在为红九棘鲈苗种的批量化繁育和良种选育奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼及性腺采集

本研究中使用的红九棘鲈全部取自海南省万宁市林兰水产有限公司。该红九棘鲈群体于 2023 年 3 月 18 日在外塘布卵, 25 h 左右孵化出膜, 30 d 后转入室内水泥池中进行培育。本研究对其进行追踪观察, 分别于 30、45、60、90、120、150、270、310、380 d、660 d 进行取样, 并在繁殖季节采集同一环境下人工养殖 1 年的 3 龄雌性。每个取样时间点均随机采集 10 尾及以上健康且活力充沛的红九棘鲈, 同时对体长、体重等生物学指标进行测量, 解剖观察性腺发育情况。

由于 30 d 鱼苗较小, 性腺难以单独完整取出, 30 d 样品取样时将鱼解剖后, 滴加适量 Bouin's 液于鱼鳔与内脏团上进行初步固定, 再将内脏团完整取出, 截取完整鱼鳔两端浸没于 4%多聚甲醛组织固定液(北京索莱宝科技有限公司)。后续取样时间点性腺可单独取出, 取出的性腺组织于 4%组织固定液中固定过夜, 后转至 75%乙醇中常温保存, 为后续石蜡切片做准备。

1.2 石蜡组织切片

将保存在 75%乙醇中的性腺样品依次进行梯度体积分数乙醇脱水, 在 80%、90%和 95%浓度的乙醇中分别浸泡 30 min, 最后在 100%乙醇中浸泡 60 min (在 30 min 时更换一次乙醇)。脱水完成后将梯度脱水之后的样品放入无水乙醇与二甲苯(V_{无水乙醇}: V_{二甲苯}=1: 1)混合溶液中浸泡 30 min,

随后放入二甲苯中浸泡 60 min (30 min 时更换一次二甲苯)。最后将样品转移至石蜡溶液中浸蜡 6 h, 随后取出进行包埋修蜡。

包埋好的组织石蜡块在切片机 LEICARM2235 (LEICA, 德国)上以 4 μm 的厚度进行连续切片。切片通过展片、烘片、脱蜡、复水、苏木精-伊红染色、脱水、透明后, 切片上滴加中性树脂封片保存。

1.3 图像处理与数据统计

制作好的组织切片在尼康生物显微镜(Elipse Ci-L)下观察、拍照记录, 用 Photoshop 图像软件进行测量和图片处理。所有测量得到的实验数据使用 Excel 和 SPSS 27 软件进行数据分析并绘制图表。

2 结果与分析

2.1 红九棘鲈性腺早期发育与卵巢分化

为了研究红九棘鲈早期性腺发育到性腺分化的完整过程, 本研究参照赵会宏等^[8]对石斑鱼卵母细胞时相划分标准进行划分, 从布卵开始对红九棘鲈的性腺发育进行了跟踪和研究, 取样用鱼保证 10 尾以上, 并测量其体长体重(表 1)。

表 1 红九棘鲈生长数据

Tab. 1 Growth data of *Cephalopholis sonnerati*

n=10; $\bar{x}\pm SE$

年龄/d age	平均体长/cm average body length	平均体重/g average body weight
30	3.0±0.1	0.93±0.18
45	4.3±0.2	7.68±1.82
60	6.3±0.35	9.83±1.55
90	9.2±0.49	35.72±6.31
120	13.1±0.88	75.82±15.33
150	17.5±1.83	125.8±41.2
270	24.9±0.85	429.76±54.52
310	25.6±1.38	491.31±61.34
380	27.4±1.08	622.29±67.54
660	36.9±1.88	1208.66±121.00
3y♀ (雌性亲鱼)	36.3±1.24	1157.60±149.64
3y♂ (雄性亲鱼)	48.7±2.38	2270.64±370.33

30 日龄(图 1a), 性原基已经逐渐发育成两个原始性腺, 位于中肾管的下侧、鳔管下方肠道上方的腹腔膜上皮上。解剖后可在鳔腔腹膜上观

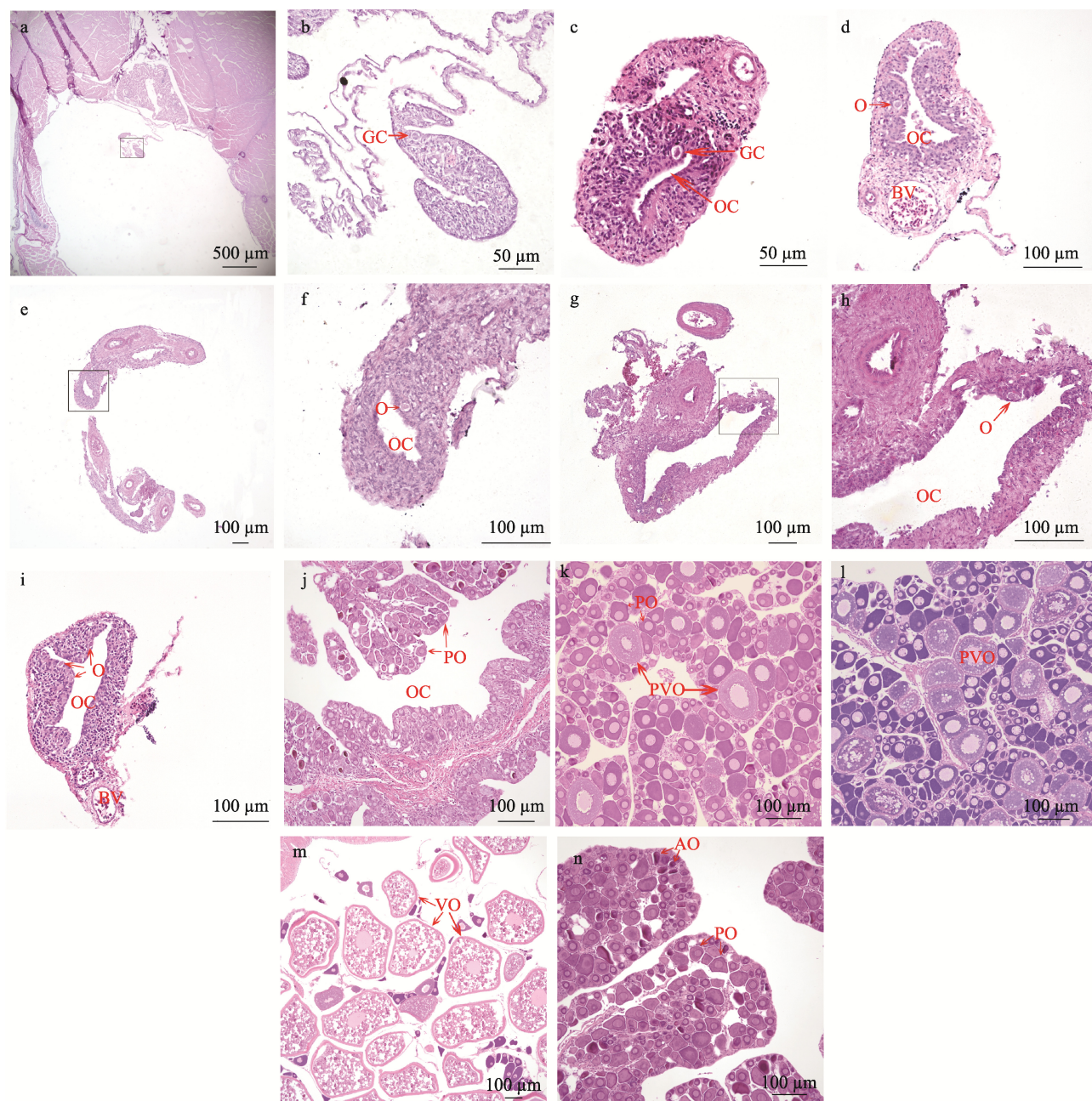


图 1 红九棘鲈性腺分期组织学切片观察

a, b. 30 日龄性腺切片图; c. 45 日龄性腺切片图; d. 60 日龄性腺切片图; e, f. 90 日龄性腺切片图; g, h. 120 日龄性腺切片图; i. 150 日龄性腺切片图; j. 270 日龄性腺切片图; k. 310 日龄性腺切片图; l. 660 日龄性腺切片图; m. 繁殖季节性腺切片图; n. 繁殖季节过后性腺切片图. b, f, h 分别是 a, e, g 放大图. AO: 闭锁的卵母细胞; BV: 血管; GC: 性原细胞; O: 卵原细胞; OC: 卵巢腔; PO: 初级生长期细胞; PVO: 卵黄发生前卵母细胞; VO: 卵黄发生期卵母细胞.

Fig. 1 Histology of different gonads of *Cephalopholis sonnerati*

a, b. Gonad histology of 30 days fish; c. Gonad histology of 45 days fish; d. Gonad histology of 60 days fish; e, d f. Gonad histology of 90 days fish; g, h. Gonad histology of 120 days fish; i. Gonad histology of 150 days fish; j. Gonad histology of 270 days fish; k.

Gonad histology of 310 days fish; l. Gonad histology of 660 days fish; m. Gonad histology during the breeding season; n. Gonad histology after the breeding season. The panel b, f and h are high magnification of the boxed areas in the panel a, e, and g respectively.

AO: atretic oocyte; BV: blood vessel; GC: gonad; O: oogonium; OC: ovarian cavity; PO: primary growth oocyte;

PVO: pre-vitellogenic oocyte; VO: vitellogenic oocyte.

观察到透明细丝。组织切片可明显观察到性腺有所弯曲,同时可观察到一个性原细胞(图 1b),相较于其他细胞体积更大且界限明显。细胞核大且透亮,占细胞体积约 2/3,细胞直径约 12~13 μm ,细胞核径约 8.9 μm 。

45 日龄(图 1c),组织中央有一条裂缝,原始卵巢腔初步形成,可以观察到血管,原始卵巢腔周围可明显观察到一个性原细胞,细胞直径 13~15 μm ,核径约 10 μm 。

60 日龄(图 1d),卵巢腔与血管进一步增大,出现完整卵巢腔,卵巢腔内缘可明显观察到一个卵原细胞。卵原细胞呈圆形,卵径约 17 μm ,核径约 9.6 μm 。

90 日龄(图 1e),此时解剖后性腺已清晰可见,呈透明细丝状附着在鳔腔腹膜上。组织切片显示,性腺进一步增大,可明显观察到卵原细胞(图 1f),卵径约 16 μm 。

120 日龄(图 1g),卵巢腔进一步增大,但是内壁仍是只能观察到一个卵原细胞(图 1h),卵原细胞进一步增大,卵径约 19.6~20 μm 。

150 日龄(图 1i),卵原细胞开始增殖,每个组织学切片都能观察到数个卵原细胞,卵径约 12~14 μm 。

270 日龄(图 1j),卵巢腔生殖上皮周围观察到大量卵原细胞,并开始分化成 II 时相初级生长期卵母细胞,细胞为多角形或圆形,细胞质嗜碱性被染成深紫色,卵径约 30~52 μm 。

310 日龄(图 1k),卵母细胞多处于 II 时相初级生长期与 III 时相卵黄生成前期。III 时相卵母细胞卵径约 88~152 μm ,该阶段卵母细胞原生质不断增加,体积进一步增大,胞质内出现皮质小泡与细小的脂肪滴和卵黄颗粒,同时核膜边缘可观察到数个核仁。

660 日龄(图 1l),切片显示初级卵母细胞进入 IV 时相卵黄积累期。IV 时相卵母细胞体积仍在迅速增长,卵径约 330~380 μm ,脂肪滴与卵黄颗粒逐渐积累充满胞质,同时细胞外围可以观察到放射带和滤泡细胞。

繁殖季节(2024 年 4 月)采集 3 龄亲鱼(图 1m),卵母细胞大多处于卵黄积累期,部分处于 V 时相

成熟期。卵黄积累期细胞质中出现许多脂肪滴和嗜酸性的卵黄小泡,卵黄小泡迅速增加并不断融合形成体积更大的卵黄球,卵母细胞通过积累卵黄球迅速增大体积,细胞外层可以显著观察到多层膜结构。V 时相卵母细胞卵径约 400~530 μm ,初级卵母细胞经分裂向次级卵母细胞过渡。细胞核极化体积变小,核膜界限模糊直至溶解消失,卵黄颗粒进一步融合变成更大的卵黄球。

繁殖季节过后(2024 年 8 月)随机取样数条 3 龄亲鱼,切片显示卵巢中仅剩 II 时相和 III 时相未发育成熟的初级卵母细胞,同时出现退化闭锁的卵母细胞(图 1n)。

综上,红九棘鲈早期性腺发育与性腺分化可分为 7 个时期。45 d 之前红九棘鲈性腺属于未分化时期(图 1a~c),该阶段性腺呈透明细丝状紧附在鳔腔腹膜上,切片显示性腺横切面为梨形,原始生殖细胞通过有丝分裂增殖形成性原细胞。60~150 d 为 I 期卵巢(图 1d~i),60 d 后卵巢腔初步形成,然后逐渐扩大,卵巢中以 I 时相的卵原细胞为主。270 d 时为 II 期卵巢(图 1j),卵巢呈白色透明,卵巢中卵原细胞大量增殖,同时部分卵原细胞进入小生长期形成 II 时相卵母细胞。310 d 时为 III 期卵巢(图 1k),卵巢表面具有丰富血管,包含大量卵粒;卵巢中以 III 时相早期细胞为主,还有部分 I、II 时相细胞。660 d 时卵巢中出现 IV 时相卵母细胞(图 1l),同时还有部分 I、II、III 时相细胞。V 期卵巢(图 1m),繁殖季节性成熟鱼卵巢发育至此阶段,人工繁育条件下 1 龄红九棘鲈未发现此阶段卵巢。此时期卵巢体积最大,占据整个腹腔,解剖后肉眼可见独立成熟卵粒,卵巢中以 V 时相、IV 时相卵母细胞为主。繁殖季节过后性腺会回退到 VI 期卵巢(图 1n),此时卵巢以 II 时相、III 时相卵母细胞为主,还有部分退化闭锁的卵母细胞。

2.2 红九棘鲈性逆转组织学观察

对人工繁育的 380 d 红九棘鲈进行取样,获得雌转雄性逆转早期样品;同时,于繁殖季节对能挤出精液的雄鱼进行取样,组织学切片结果如下:

兼性早期性腺(图 2a 和图 2d): 参考彭诚^[14]的

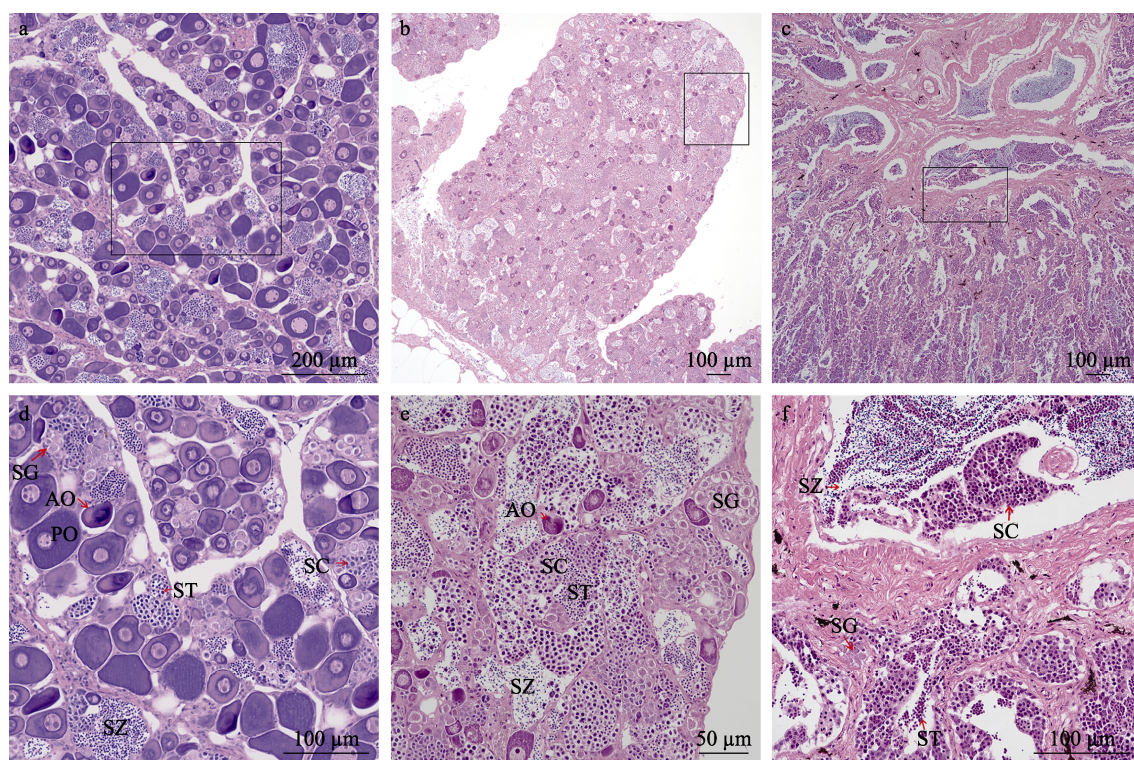


图 2 红九棘鲈雌转雄性逆转组织学切片观察

a. 380 日龄性逆转早期性腺切片; b. 性逆转晚期性腺切片; c. 雄性性腺切片. d、e、f 分别是 a、b、c 放大图.

AO: 闭锁卵母细胞; PO: 初级生长期细胞; SC: 精母细胞; SG: 精原细胞; ST: 精子细胞; SZ: 精子.

Fig. 2 Histology of gonad during female-to-male sex reversal of *Cephalopholis sonnerati*

a. Histology of early intersex-traditional phase of 380 days fish; b. Histology of late intersex-traditional phase; c. Histology of male phase. The panels d, e and f are high magnification of the boxed areas in the panels a, b, and c respectively. AO: atretic oocyte; PO: primary growth oocyte; SC: spermatocyte; SG: spermatogonium; ST: spermatid; SZ: spermatozoid.

划分方法, 将精母细胞的出现作为卵巢进入兼性性腺的标志。切片结果显示兼性早期性腺中大部分还是 II、III 时相的卵母细胞, 同时可观察到少量闭锁卵母细胞、精母细胞和精子细胞。

兼性晚期性腺(图 2b 和图 2e): 该阶段性腺以不同发育阶段的雄性生殖细胞为主, 精原细胞与精母细胞大量增殖, 形成形态清晰的精小囊。同时仍可观察到少数闭锁的卵母细胞, 但是卵母细胞闭锁形成的空腔消失, 精小囊占据性腺绝大部分位置, 部分次级精母细胞发育成精子细胞, 精子发生活跃, 此时用力挤压鱼体腹部有少许精液流出。

雄性性腺(图 2c 和图 2f): 此阶段轻轻按压鱼体腹部, 有白色精液从生殖孔流出。组织学显示性腺中只存在不同阶段的雄性生殖细胞, 精巢中精子发生活跃, 大量精子细胞成熟后经变形形成精子, 部分区域精小囊消失, 大量精子填满精小囊内壁。

2.3 红九棘鲈为先雌后雄类型

上述结果证明红九棘鲈为功能性雌雄同体鱼类, 为探究红九棘鲈雌雄同体类型为同时成熟还是顺序型成熟, 对人工繁育 380 d 的红九棘鲈取样 40 条, 进行组织石蜡切片分析。切片结果显示 40 条中有 1 条处于兼性早期(图 2a), 14 条处于 II 期卵巢, 25 条处于 III 期卵巢(图 3), 未发现雄性。

380 d 时已经是繁殖季节, 红九棘鲈性腺尚未发育成熟, 98% 分化为雌性, 2% 发生性逆转为兼性早期(图 4), 因此可以认定红九棘鲈性腺发育为雌雄同体中的先雌后雄类型。

3 讨论

3.1 红九棘鲈早期性腺发育

性腺发育是繁殖特性研究基础之一, 通过组织学方法掌握性腺发育规律有助于开展人工繁育

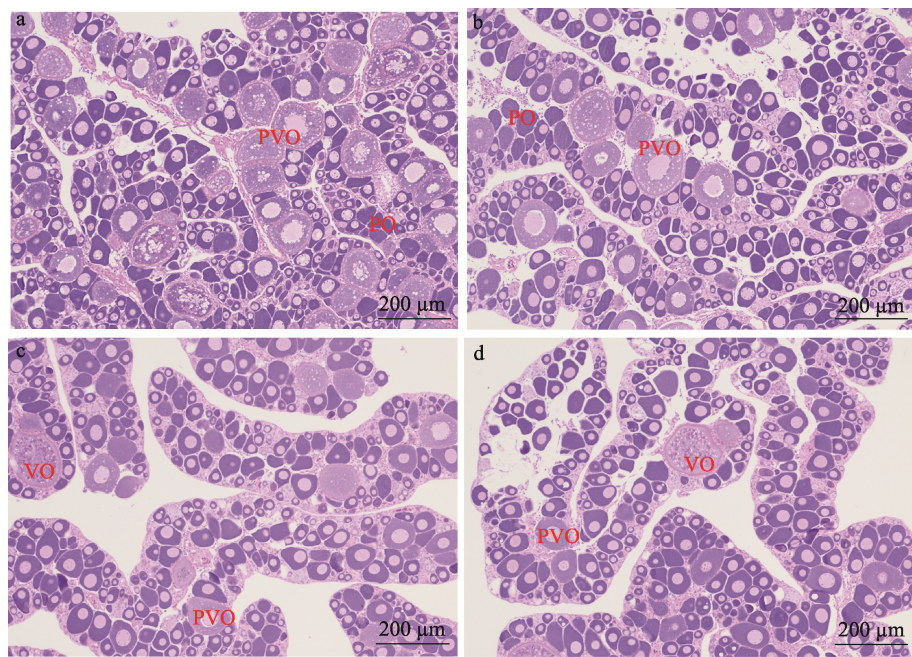


图 3 部分 380 日龄红九棘鲈性腺分期组织学切片观察
a, b, c, d 为 III 期卵巢. PO: 初级生长期细胞; PVO: 卵黄发生前卵母细胞.
Fig. 3 Histology of gonad in Partial *Cephalopholis sonnerati* individuals of 380 d
a, b, c, d showing stage III ovary. PO: primary growth oocyte; PVO: pre-vitellogenic oocyte.

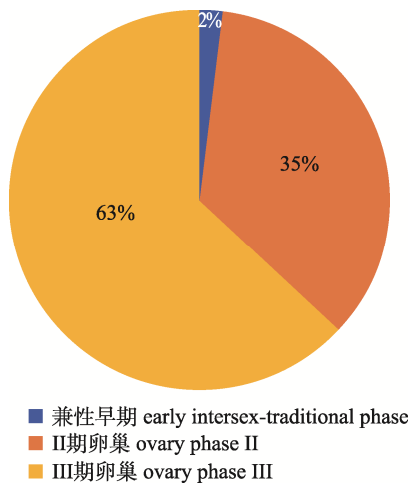


图 4 380 日龄红九棘鲈在不同性腺分期的占比
Fig. 4 Proportions of sampled 380 d *Cephalopholis sonnerati* individuals at different phases of gonadal development

和性腺调控等研究。鱼类在早期胚胎发育时期就出现原始生殖细胞,原始生殖细胞通过不同的迁移方式迁移至生殖嵴形成原始性腺,原始性腺再进一步分化为卵巢或者精巢^[15]。不同鱼类原始性腺分化时间不一致,草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)原始性腺正式形成是 60 d^[16];胡子鲇(*Clarias fuscus*) 10 d 即可观察到原始性腺^[17];斜带石斑鱼

则是在 20 d 开始形成原始性腺^[18]。本研究中发现红九棘鲈 30 d 可观察到原始性腺已正式形成,45 d 可观察到原始卵巢腔形成。不同鱼类原始卵巢腔形成方式不同,斑石鲷(*Oplegnathus punctatus*)和斜带石斑鱼是由性腺两端出现延伸的体细胞组织,两组织突伸长靠拢最后形成卵巢腔^[18-19];大黄鱼(*Larimichthys crocea*)原始卵巢腔的形成方式为卵巢腹部出现组织突,向性腺背部延伸,其体细胞组织向腹面延伸,最后融合形成卵巢腔^[20];而红九棘鲈原始卵巢腔形成方式与上述均不相同,更加类似于泰山螭霖鱼(*Varicorhinus macrolepis*)^[21],45 d 先出现由原始性腺内裂形成的纵裂小腔,然后小腔不断扩大形成卵巢腔(图 1c~d)。

3.2 红九棘鲈性腺分化

卵巢腔的形成往往被认为是形态学上性腺向雌性分化的标志^[22],其形成时间上也有一定差异。巴拉马尔石斑鱼(*Epinephelus malabaricus*)孵化后 74 d 出现原始卵巢腔,144 d 两端合围形成完整卵巢腔^[23];斜带石斑鱼的卵巢腔开始形成在 90 d,110 d 时延伸的体细胞组织开始包围形成完整的卵巢腔^[18]。本研究中红九棘鲈 45 d 开始出现原始

卵巢腔, 60 d 已经形成完整卵巢腔, 这表明红九棘鲈卵巢腔的形成比其他石斑鱼早。

综合参考刘筠^[24]和赵会宏等^[8]对性腺发育分期标准, 红九棘鲈卵细胞可分为 6 个时相, 根据不同时相卵母细胞组成可将卵巢发育分为 6 个时期。I 时相卵细胞为卵原细胞, 细胞核明显; II 时相卵细胞为小生长期的初级卵母细胞, 卵母细胞形态不规则, 细胞质含量增加, 嗜碱性反应强; III 时相初级卵母细胞体积进一步增大, 出现皮质小泡与细小的脂肪滴, 核膜边缘可观察到数个核仁; IV 时相初级卵母细胞主要特征为出现放射带, 卵黄颗粒密集分布在细胞核周围, 并逐渐充满胞质; V 时相初级卵母细胞开始向次级卵母细胞过渡, 细胞核极化体积变小, 核膜溶解消失, 卵黄颗粒互相融合成卵黄球; VI 时相为退化的卵母细胞, 卵母细胞逐渐萎缩退化, 卵黄破裂, 随后卵黄等物质均被重新吸收, 滤泡呈空泡状。红九棘鲈孵化后 60 d 出现卵原细胞, 孵化后 270 d 可观察到 II 时相初级生长期初级卵母细胞, III 时相卵黄生成前期初级卵母细胞出现于孵化后 310 d, 孵化后 660 d 可见 IV 时相卵黄积累期初级卵母细胞。石斑鱼性腺发育具有季节性、周期性^[25], 3 月为产卵前季节, 4—5 月为第一产卵季节, 只有在繁殖季节和繁殖前季节能观察到 IV 期和 V 期卵巢^[8,14]。初次性成熟也是鱼类繁殖特性研究的重要部分, 云龙石斑鱼 1~2 龄发育至 I 期卵巢, 4~5 龄才发育至 III 期卵巢^[10]; 黑边石斑鱼(*Epinephelus fasciatus*)作为中小型石斑鱼类, 3 龄检测到初次性成熟, 9 龄检测到兼性个体^[26]。此外人工繁育条件也可能对鱼类初次性成熟时间造成影响: 人工繁育条件下褐菖鲉(*Sebastes marmoratus*)雌鱼 2 龄方可达到性成熟^[27], 然而自然环境下褐菖鲉雌鱼 1 龄即可成熟^[28]; 黑边石斑鱼养殖群体 2 龄即可检测到成熟个体^[29], 野外捕获的群体最早在 3 龄才能检测到成熟个体^[26]; 斜带石斑鱼初次性成熟约 3~4 龄, 人工繁育条件下可提前至 2.5 龄^[8], 而在初次性成熟之前只能观察到 III 期及前面时期的卵巢^[8,18]。

本研究对红九棘鲈进行 22 个月(2023 年 3 月至 2025 年 1 月)的追踪调查, 研究表明红九棘鲈

60~150 d 为 I 期卵巢, 270~380 d 为 III 期卵巢, 660 d 为 IV 期卵巢, 之后未发现 V 期的卵巢, 在 2024 年 4 月繁殖季节采集到了 V 期卵巢(图 1m)。和其他石斑鱼相类似的是, 红九棘鲈一年半时间尚不能达到初次性成熟, 后续仍需继续追踪观察; 和其他石斑鱼的不同之处在于, 红九棘鲈不仅生长快, 性腺早期发育分化也比其他石斑鱼要更早一些。本研究中红九棘鲈在 150 d 时仍为 I 期卵巢, 380 d 时已经可以观察到 IV 时相卵母细胞, 性腺发育迅速。造成这种现象的原因可能是石斑鱼类性成熟呈季节性周期性变化^[30-32], 380 d 时已经到了红九棘鲈繁殖前季节; 还有可能是人工繁育条件下养殖环境稳定, 食物来源稳定, 营养充足, 相较自然生存环境更有利于性腺发育。但未观察到 380 d 红九棘鲈 IV 中期和 IV 晚期的卵巢, 后续仍需对红九棘鲈进行追踪观察, 以明确红九棘鲈初次性成熟时间点。

3.3 红九棘鲈性腺发育特点

根据卵巢发育特点, 林浩然^[33]将产卵类型分为 3 种: 完全同步型, 卵巢内同时只存在一种发育时相卵母细胞, 繁殖季节只产卵一次, 如厚唇裂腹鱼^[34](*Schizothorax irregularis*); 分批同步型, 卵巢中存在两个以上发育阶段的卵母细胞, 繁殖季节产卵一次, 如翎电鳗^[35](*Apteronotus albifrons*); 分批非同步型, 卵巢中同时存在多个时相卵母细胞, 卵径呈连续性分布, 繁殖周期长, 一年可多次产卵, 如黄鳍金枪鱼^[36](*Thunnus albacares*)、绿鳍马面鲀^[37](*Thamnaconus modestus*)和花身副丽鱼^[38](*Cichlasoma managuense*)。本研究中红九棘鲈在卵巢不同时期都有不同时相的卵母细胞, 如 IV 期卵巢中可以观察到 I、II、III 和 IV 时相卵母细胞, 且从 I 时相到 V 时相卵母细胞卵径逐步增加, 说明红九棘鲈产卵类型为异步成熟、多次产卵。

目前, 所有现存硬骨鱼物种中约有 2%被证实具有功能性雌雄同体, 即同一个体在生活史中有能力发育成雌雄两种性别并且均具有繁殖能力^[39]。而功能性雌雄同体又可以分为 3 种类型: 雌雄同体雌雄同步成熟, 如花斑溪鲈(*Kryptolebias marmoratus*), 同时拥有成熟的精巢和卵巢^[31]; 雌雄同体雄性先熟, 如黑鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)

和眼斑双锯鱼(*Amphiprion ocellaris*), 生活史初始阶段为雄性^[40-41]; 雌雄同体雌性先熟, 如贝氏隆头鱼^[42](*Labrus bergylta*)和大部分的石斑鱼^[7-10,30-32]。以斜带石斑鱼为例, 性逆转主要特征为卵巢发育成熟后, 触发卵巢退化机制, 成熟的卵母细胞退化萎缩, 卵泡闭锁, 精母细胞开始大量增殖^[7]。但在斜带石斑鱼中发现极少数原发性雄鱼^[43], 赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*)有 20%为原发性雄鱼^[31]。性逆转是一个复杂的生理过程, 自然条件下绝大多数性逆转都是受社会环境因素控制的。已有研究可通过控制社群诱导斜带石斑鱼由雌到雄、由雄到雌两种性转变^[32]。本研究中对 1 龄红九棘鲈随机取样 40 条, 发现 98%为雌性, 只有一条处于兼性早期。因此笔者认为红九棘鲈为雌性先熟的顺序型雌雄同体。和其他石斑鱼不同之处在于, 红九棘鲈 1 龄就有性逆转现象, 无须经过初次性成熟。对于这种现象笔者推测, 与红九棘鲈野外群体相比, 人工繁育群体中由于是一个全新社会群体, 该群体中一开始只有雌性, 因此在繁殖季节来临时, 会有部分个体由社群因素诱导雌转雄性逆转。类似的是人工养殖条件下赤点石斑鱼 17 cm 即发现性逆转的功能性雄鱼, 但自然环境下体长 27 cm 仍未见雄鱼^[26]。本研究在后续取样中, 未发现可挤出精液、性逆转完全的雄性个体, 尚不清楚 1 龄红九棘鲈是完全性逆转成雄性, 还是以一种未成熟性腺, 即 II、III 时相卵母细胞和精母细胞共存的形式度过繁殖季节。因此在后续实验中, 还需对红九棘鲈性逆转是否完全进行研究。

综上所述, 本研究查明了人工繁育的红九棘鲈早期性腺发育规律和性腺分化特征, 弄清红九棘鲈早期性腺发育的时间点和性腺发育分期, 对红九棘鲈性腺发育类型、繁殖特性进行了深入分析和探讨。研究结果为红九棘鲈人工繁育提供了基础资料, 为红九棘鲈性别控制育种研究提供理论依据。

参考文献:

- [1] Zhuang X, Qu M, Zhang X, et al. A comprehensive description and evolutionary analysis of 22 Grouper (*Perciformes*, *Epinephelidae*) mitochondrial genomes with emphasis on two novel genome organizations[J]. PLoS One, 2013, 8(8): e73561.
- [2] Rimmer M A, Glamuzina B. A review of grouper (Family Serranidae: Subfamily *Epinephelinae*) aquaculture from a sustainability science perspective[J]. Reviews in Aquaculture, 2019, 11(1): 58-87.
- [3] Morris A V, Roberts C M, Hawkins J P. The threatened status of groupers (*Epinephelinae*)[J]. Biodiversity & Conservation, 2000, 9(7): 919-942.
- [4] Moravec F, Justine J L. New records of species of *Philometra* (Nematoda: Philometridae) from marine fishes off New Caledonia, including *P. cephalopholidis* sp. n. from *Cephalopholis sonnerati* (Serranidae)[J]. Parasitology Research, 2015, 114(9): 3223-3228.
- [5] Justine J L. *Pseudorhabdosynochus argus* n. sp. (Monogenea: Diplectanidae) from *Cephalopholis argus*, *P. minutus* n. sp. and *Diplectanum nanus* n. sp. from *C. sonnerati* and other monogeneans from *Cephalopholis* spp. (Perciformes: Serranidae) off Australia and New Caledonia[J]. Systematic Parasitology, 2007, 68(3): 195-215.
- [6] Shpigel M, Fishelson L. Territoriality and associated behaviour in three species of the genus *Cephalopholis* (Pisces: Serranidae) in the Gulf of Aqaba, Red Sea[J]. Journal of Fish Biology, 1991, 38(6): 887-896.
- [7] Zhao H H, He Q, Zhang C L, et al. A review of studies on sex differentiation and sex change in hermaphroditic fishes[J]. Journal of Fisheries of China, 2022, 46(4): 644-656. [赵会宏, 何琪, 张春丽, 等. 雌雄同体鱼类性别分化及性转变研究进展[J]. 水产学报, 2022, 46(4): 644-656.]
- [8] Zhao H H, Liu X C, Liu F Y Z, et al. Seasonal cycles of ovarian development and serum sex steroid levels of female grouper *Epinephelus coioides*[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2003, 42(6): 56-59, 63. [赵会宏, 刘晓春, 刘付永忠, 等. 斜带石斑鱼雌鱼卵巢发育与血清性类固醇激素的生殖周期变化[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2003, 42(6): 56-59, 63.]
- [9] Qiu Y S, Ding X Y, Li Z T, et al. Comparative analysis of ovarian development and sex steroid hormone levels in hybrid Jinhu grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀×*Epinephelus tukula* ♂) and *Epinephelus fuscoguttatus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2023, 30(4): 457-467. [邱弈树, 丁小雨, 李振通, 等. 杂交种“金虎石斑鱼”与棕点石斑鱼卵巢发育及性类固醇激素水平比较[J]. 中国水产科学, 2023, 30(4): 457-467.]
- [10] Li Z Q, Cheng M L, Wang L N, et al. Ploidy and gonadal development of *Epinephelus moara* ♀ and *Epinephelus moara* ♂×*Epinephelus lanceolatus* ♂[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2021, 41(4): 134-141. [李子奇, 成美

- 玲, 王林娜, 等. 云龙石斑鱼、云纹石斑鱼倍性及性腺发育比较[J]. 广东海洋大学学报, 2021, 41(4): 134-141.]
- [11] Xie Z Z, Wang D D, Jiang S J, et al. Chromosome-level genome assembly and transcriptome comparison analysis of *Cephalopholis sonnerati* and its related grouper species[J]. Biology, 2022, 11(7): 1053.
- [12] Alghamdi J, Al-Quraishy S, Abdel-Gaber R. Morphological and molecular phylogenetic analysis of *Bivesicula claviformis* Yamaguti, 1934 infecting the tomato hind *Cephalopholis sonnerati* (Serranidae) in Saudi Arabia[J]. Journal of King Saud University-Science, 2022, 34(4): 101936.
- [13] Saengpheng C, Purivirojkul W. Three new species of *Pseudorhabdosynochus* (Monogenea, Diplectanidae) from several species of *Cephalopholis* and *Epinephelus* (Perciformes, Serranidae) from Thailand[J]. Parasite, 2022, 29: 48.
- [14] Peng C. The functional study of gonadotropins regulating sex change in the orange spotted grouper (*Epinephelus coioides*)[D]. Guangzhou: Sun Yat-Sen University, 2018. [彭诚. 促性腺激素调控斜带石斑鱼性逆转的功能研究[D]. 广州: 中山大学, 2018.]
- [15] Piprek R P, Kloc M, Kubiak J Z. Early development of the gonads: Origin and differentiation of the somatic cells of the genital ridges[J]. Results and Problems in Cell Differentiation, 2016, 58: 1-22.
- [16] Qi B, Li S J, Du J X, et al. Gonadal histology and expression analysis of sex characteristic genes in grass carp at different ages[J/OL]. Progress in Fishery Sciences, 2024: 1-11. (2024-07-04). <https://doi.org/10.19663/j.issn2095-9869.20240202002>. [祁博, 李胜杰, 杜金星, 等. 草鱼不同月龄性腺组织学观察及性别特征基因 *cyp19a1a* 和 *amh* 的表达分析[J/OL]. 渔业科学进展, 2024: 1-11. (2024-07-04). <https://doi.org/10.19663/j.issn2095-9869.20240202002>.]
- [17] Wang W D, Zhu C H, Deng S P, et al. Occurrence and differentiation of gonad in *Clarias fuscus*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2012, 36(5): 993-997. [王文达, 朱春华, 邓思平, 等. 胡子鲇性腺发生与分化组织学研究[J]. 水生生物学报, 2012, 36(5): 993-997.]
- [18] Wang Q. Artificial sex control in grouper[D]. Guangzhou: Sun Yat-Sen University, 2017. [王庆. 石斑鱼性别人工控制研究[D]. 广州: 中山大学, 2017.]
- [19] Zhao Y Z, Chen Z F, Ma T, et al. Histological observation and preliminary analysis of gonad development in spotted knifejaw (*Oplegnathus punctatus*)[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2021, 30(4): 675-683. [赵玉柱, 陈张帆, 马腾, 等. 斑石鲷性腺发育的组织学观察与初步分析[J]. 上海海洋大学学报, 2021, 30(4): 675-683.]
- [20] You X R, Cai M Y, Jiang Y H, et al. Histological observation on gonadal sex differentiation in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(7): 1057-1064. [游秀容, 蔡明夷, 姜永华, 等. 大黄鱼性腺性别分化的组织学观察[J]. 水产学报, 2012, 36(7): 1057-1064.]
- [21] Song H, Wang S Y, Peng K M. Study on the occurrence of primordial germ cells and gonadal differentiation in *Varicorhinus macrolepis*[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2005, 26(12): 62-67. [宋卉, 王树迎, 彭克美. 泰山螭鱼原始生殖细胞的发生及性腺分化规律的研究[J]. 动物医学进展, 2005, 26(12): 62-67.]
- [22] 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.]
- [23] Murata R, Karimata H, Ashraful Alam M, et al. Gonadal sex differentiation in the Malabar grouper, *Epinephelus malabaricus*[J]. Aquaculture, 2009, 293(3-4): 286-289.
- [24] Liu Y. Reproductive Physiology of Main Cultivated Fish in China[M]. Beijing: Agricultural Publishing House, 1993: 197. [刘筠. 中国养殖鱼类繁殖生理学[M]. 北京: 农业出版社, 1993: 197.]
- [25] Chen J X, Xiao L, Peng C, et al. Socially controlled male-to-female sex reversal in the protogynous orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*[J]. Journal of Fish Biology, 2019, 94(3): 414-421.
- [26] Xu W G, Liu L M, Tang Y Z, et al. Investigation on the interrelation between total length, age, sex maturation and sex reversal in *Epinephelus fasciatus*[J]. Marine Fisheries, 2021, 43(1): 51-60. [徐文刚, 刘立明, 唐永政, 等. 黑边石斑鱼体长、年龄与性成熟、性逆转的关系研究[J]. 海洋渔业, 2021, 43(1): 51-60.]
- [27] Zou X, Ruan Z C, Zhang Y, et al. Reproductive biology of fish *Sebastiscus marmoratus* under artificial breeding[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2024, 55(4): 1027-1036. [邹雄, 阮泽超, 张燕, 等. 人工繁育条件下的褐菖鲉 (*Sebastiscus marmoratus*) 繁殖特性研究[J]. 海洋与湖沼, 2024, 55(4): 1027-1036.]
- [28] Lin D J, You Y L. The ovarian cyclical development of ovoviviparous teleost, *Sebastiscus marmoratus*[J]. Zoological Research, 2000, 21(4): 269-274. [林丹军, 尤永隆. 卵胎生硬骨鱼褐菖鲉卵巢的周期发育研究[J]. 动物学研究, 2000, 21(4): 269-274.]
- [29] Kawabe K, Kohno H. Effects of feeding frequency and stocking density on the survival, growth and feed conversion efficiency of reared young blacktip grouper *Epinephelus*

- fasciatus*, during intermediate culture[J]. *Aquaculture Science*, 2014, 62(3): 289-294.
- [30] Liu R Q. Study on growth, reproduction habits and population genetic structure of *Epinephelus awoara* in southeast coast of China[D]. Xiamen: Xiamen University, 2020. [刘瑞祺. 我国东南沿海青石斑鱼生长、繁殖习性及其群体遗传结构研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2020.]
- [31] Qu M. Comparative studies on the sex development of two hermaphroditic fish species-*Epinephelus akaara* and *Kryptolebias marmoratus*[D]. Xiamen: Xiamen University, 2019. [曲朦. 两种雌雄同体鱼类——赤点石斑鱼和花斑溪鲷性别发育的比较研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2019.]
- [32] Chen J X. The study of socially controlled sex change in the orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*)[D]. Guangzhou: Sun Yat-Sen University, 2020. [陈嘉兴. 社会控制诱导斜带石斑鱼性转变的研究[D]. 广州: 中山大学, 2020.]
- [33] Lin H R. Fish Physiology[M]. Guangzhou: Guangdong Higher Education Press, 2007. [林浩然. 鱼类生理学[M]. 广州: 广东高等教育出版社, 2007.]
- [34] Zhao H, Zhao N H, Li L, et al. Gonadal development and changes in concentration of serum sex hormones in *Schizothorax irregularis*[J]. *Fisheries Science*, 2023, 42(2): 233-240. [赵贺, 赵年桦, 李丽, 等. 厚唇裂腹鱼性腺发育周期及血清中性激素含量变化[J]. *水产科学*, 2023, 42(2): 233-240.]
- [35] Ha C X, Yang C H, Wang W, et al. Histological observation of ovarian development of apteronotid eel *Apteronotus albifrons*[J]. *Fisheries Science*, 2021, 40(3): 403-408. [哈承旭, 杨翠华, 王玮, 等. 翎电鳗卵巢发育组织学研究[J]. *水产科学*, 2021, 40(3): 403-408.]
- [36] Huang W X, Fu W Y, Pan S, et al. Morphology and histology characteristics of gonads of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) at different developmental stages in South China Sea[J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2024, 37(2): 98-106. [黄雯晓, 符文雅, 潘帅, 等. 南海黄鳍金枪鱼性腺发育形态观察和组织学研究[J]. *水产学杂志*, 2024, 37(2): 98-106.]
- [37] Mao X T, Liu L M, Wang J L, et al. Histological observation on the gonadal development of the parental *Thamnaconus modestus* during early reproductive regulation[J]. *Journal of Fisheries Research*, 2024, 46(1): 11-18. [毛欣童, 刘立明, 王九龙, 等. 绿鳍马面鲀早繁生殖调控期间亲鱼性腺发育的组织学观察[J]. *渔业研究*, 2024, 46(1): 11-18.]
- [38] Jin F P, Zuo P X, Zhao J X, et al. Histological observation and preliminary analysis of gonadal development in *Cichlasoma managuense*[J]. *Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science)*, 2024, 39(2): 70-75. [金方彭, 左鹏翔, 赵静霞, 等. 花身副丽鱼性腺发育组织学观察与初步分析[J]. *云南农业大学学报(自然科学)*, 2024, 39(2): 70-75.]
- [39] Avise J C, Mank J E. Evolutionary perspectives on hermaphroditism in fishes[J]. *Sexual Development*, 2009, 3(2-3): 152-163.
- [40] Wu G C, Tomy S, Lee M F, et al. Sex differentiation and sex change in the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegelii*[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 167(3): 417-421.
- [41] Godwin J R, Thomas P. Sex change and steroid profiles in the protandrous anemonefish *Amphiprion melanopus* (Pomacentridae, Teleostei)[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 1993, 91(2): 144-157.
- [42] Muncaster S, Norberg B, Andersson E. Natural sex change in the temperate protogynous Ballan wrasse *Labrus bergylta*[J]. *Journal of Fish Biology*, 2013, 82: 1858-1870.
- [43] Li S S, Li W S, Jiang S J, et al. Mechanisms of sex differentiation and sex reversal in hermaphrodite fish as revealed by the *Epinephelus coioides* genome[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2023, 23(4): 920-932.

Gonadal development regularity and characteristics of *Cephalopholis sonnerati* under artificial breeding

WANG Chongwei^{1, 2}, LI Xue¹, LI Chaowei^{1, 2}, LU Sheng¹, SONG Yu¹, LIU Yang¹, CHEN Songlin¹

1. State Key Laboratory of mariculture Biobreeding and Sustainable Goods; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China

Abstract: As an important part of grouper culture, tomato hind (*Cephalopholis sonnerati*) is a rare fish species in China, which has a huge consumer market and broad prospects. Gonad samples of tomato hind from 30 to 660 days were observed using dissection and histological methods to investigate the early gonadal development, gonadal differentiation, and reproductive characteristics of tomato hind under artificial breeding. The results showed that tomato hind is a typical functional protogynous hermaphrodite species with asynchronous ovarian maturation and multiple spawning events. The oocytes can be divided into six phases, and the development of ovarian can be classified into six periods based on the largest transverse section area occupied by different phases of oocytes. Primitive ovarian cavity appeared at 45 days after hatching. The ovarian cavity was observed at 60 days after hatching, indicating the beginning of morphological differentiation of the ovaria. Oogonial began to proliferate at 150 days after hatching. The ovaries developed to stage II at 270 days after hatching, with phase II oocytes predominant and oogonial being activated to proliferate. The ovaries of tomato hind developed rapidly, reaching stage III at 310 days after hatching, and the volume of oocytes increased significantly. The ovaries reached stage IV at 660 days after hatching, when the volume of oocytes increased further and oocytes were filled with yolk. Ovaries of stage V were sampled during the breeding season. The nuclear membrane disappeared, and the yolk homogenized. After the breeding season, the ovaries reached stage VI, were dominated by phase II and III oocytes, and degeneration of oocyte were observed.

In many cases, the occurrence of sex change is under social control, such as the disappearance of the dominant individual. Under artificial breeding conditions, sex reversal could occur before first sexual maturation at 380 days after hatching in tomato hind. The histology showed that most oocytes were in phases II and III in the early intersex traditional phase, while a few atretic oocytes, spermatocytes, and sperm cells could be observed. We speculated that the artificial breeding population of tomato hind was a new social group, which only had females at the beginning. Therefore, when the breeding season comes, some individuals will be induced by social factors to sex reversal. This study showed the gonad development and differentiation characteristics of tomato hind under artificial breeding, providing a reference for large-scale artificial breeding and a theoretical basis for sex control breeding.

Key words: *Cephalopholis sonnerati*; gonadal development; gonadal differentiation; sex reversal

Corresponding author: CHEN Songlin. E-mail: chensl@ysfri.ac.cn