

甲基睾丸酮诱导鲫鱼雌核发育子代性转化的研究*

陈 本 德

(中国科学院水生生物研究所)

提 要

本文介绍了用甲基睾丸酮诱导鲫鱼雌核发育子代性转化的研究结果。对孵化后3天的人工雌核发育的红鲫仔鱼和天然雌核发育的银鲫仔鱼,以含有不同量的甲基睾丸酮激素饵料喂养90天,再用一般饵料喂养直到可以剖腹鉴别性别。结果是:1,喂用每克 $MT_{25-30\mu g}$ 激素饵料的,除1尾发育为精卵巢外,全部试验鱼都发育成雄性;2,喂用每克含 $MT_{50-100\mu g}$ 激素饵料的,没有雄性鱼出现。此外,用1ml工业酒精同1g饵料配制的混合饵料,喂养90天的试验鱼,有60—84.6%的个体发育成雄性。不加激素和酒精的饵料喂养的对照组鱼,全部发育成雌性。

实验已知天然雌核发育三倍体银鲫(雌)和兴国红鲤(雄)人工受精发育的子代(简称异育银鲫),⁽⁴⁾以及红鲫的人工雌核发育子代都是雌性个体,而为了大量繁殖它们的纯系后代,还需要有一定数量的与它们遗传性相同的雄鱼,因此我们进行了鲫鱼的人工转性试验。近几年来,国内外应用雄激素甲基睾丸酮(Methyltestosterone,简称MT)诱导鱼类性转化(雄性化)已经取得了显著成效^[2,8,5,7,9,10],所以本试验也采用甲基睾丸酮,希望通过口服能使异育银鲫和人工雌核发育红鲫由雌性转化为雄性鱼。试验中我们比较了不同剂量甲基睾丸酮诱导鲫鱼性转化的效果,并意外地发现95%工业酒精也具有诱导鲫鱼雄性化的效果。

材 料 和 方 法

本试验于1978—1980年进行。人工转性试验的鱼有方正银鲫(♀)×兴国红鲤(♂)的雌核发育子代(F_1)及其与兴国红鲤(♂)回交的子代(F_2)(以下都简称为异育银鲫),以及红鲫(♀)×草鱼(♂)(精液先经辐射处理)人工雌核发育的子代(F_1)^[4]。试验鱼从孵化后第3天即开始用含有雄激素MT(Holland出品)的配合饲料喂养。

* 本文承蒋一珪副教授审阅。梁绍昌同志参加部分工作。洪雪峰同志协助组织学工作。何楚华和许克圣同志协助拍摄照片。谨致谢意。

(1) 蒋一珪等,异源精子在银鲫(*Carassius auratus gibelio*)雌核发育子代中的生物学效应。(待发表)

甲基睾丸酮(MT)先溶于95%工业酒精(武汉酒精厂出品),配制成每100毫升酒精含2.5毫克、3.0毫克、5.0毫克和10.0毫克等不同含量的雄激素溶液。然后按1份溶液均匀地拌入1份100克配合饲料(鱼粉50%、豆饼粉50%),分别配制成每克饲料含有25、30、50和100微克MT的雄激素饲料(分别简称 $MT_{25,30,50,100}$ 等激素饵料),在 50° — 60° C烘箱中烘干即可保存使用。同时配制2份对照饲料,1份按上法用不含MT的95%工业酒精配制(简称95% Alc. 组饵料),另1份则是既不含MT,又无酒精的配合饵料(简称对照组饵料)。激素饵料和对照饵料的日投量约为鱼体重的7%,每日分上、下午两次投喂。

在MT各组,95%Alc.组和对照组,各用40尾仔鱼在同样大小的玻璃缸内喂养,30天以后,鱼体已逐渐长大,再把它们分别转移到大水缸喂养60天,即停止激素喂养。最后把试验组和对照组的鱼都移入室外小水泥池,用一般商品饲料继续喂养1—2个月。这时鱼的体长范围均可达到6.2—11.6厘米,体重范围为5—31.2克,其性腺也已发育到用肉眼可以鉴定性别的程度。

为了进一步检验性转化情况,进行了性腺组织学观察。性腺用 Bouin 氏液固定,石蜡切片,Heidenhain 氏苏木精法染色。

试验结果

(一) 不同剂量甲基睾丸酮和95%工业酒精对于异育银鲫,人工雌核发育红鲫的性转换效应

1. MT_{50} 、 MT_{100} 和 95%Alc. 各组的异育银鲫的性转换效应

在停止喂食雄性激素后一个月, MT_{50} 组鱼的平均体长为8.91厘米,平均体重为10.67克; MT_{100} 组鱼的平均体长为9.18厘米,平均体重为9.3克;95%Alc.组鱼的平均体长为8.75厘米,平均体重为10.46克。以上各组鱼的生长情况较为一致,外部形态也无副性征出现。解剖检查各组鱼的性腺,仅95%Alc.组的鱼发生了性转换,其余两组鱼都未发生性转换。

在 MT_{50} 试验组成活下来的24尾鱼中,有23尾雌性鱼,1尾雌雄间性鱼; MT_{100} 试验组成活的13尾鱼均为雌性鱼;而95%Alc.组成活的26尾鱼中有22尾为雄性鱼,其余4尾为雌性鱼(表1)。在检查中观察到 MT_{50-100} 两组和95%Alc.组试验鱼的性腺有明显的形态差别, MT_{50-100} 两组试验鱼的性腺(卵巢)显著萎缩(图1),而且有相当数量个体仅在体腔一侧有一发育不完全的卵巢。而95%Alc.组试验鱼转化成的雄性性腺(精巢)

表1 MT_{50} 、 MT_{100} 和 95% Alc. 各组的异育银鲫性转换效应

试验日期	试验鱼	试验组别	试验鱼数 (尾)	喂养90天 后成活鱼数 (尾)	性 别 (尾)		
					♂	♀	♀
1978年	(银鲫♀×兴国红鲤♂) F_1 ♀×兴国红鲤♂	MT_{50}	40	24		23	1
		MT_{100}	40	13		13	
		95%Alc.	40	26	22	4	



图1. MT_{100} 试验组的回交异育银鲫, ♀性。性腺未转化, 右侧有一发育不全的卵巢, 左侧没有卵巢。

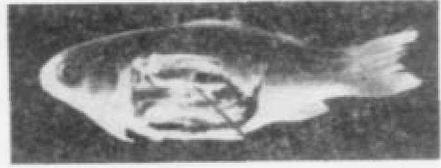


图2. 95% Alc. 试验组的回交异育银鲫, ♂性。性已转化, 示发育正常的精巢。

宽而发育正常(图2), 镜检时精子活动。

试验结果表明, MT_{50-100} 两组的雄激素剂量不能把异育银鲫性转换成雄性鱼, 反而抑制了卵巢的发育, 而用 95% Alc. 组饵料喂养的异育银鲫却可以性转换成雄性鱼(占 84.6%), 效果显著。

2 MT_{25} 、 MT_{30} 和 95% Alc. 各组的人工雌核发育红鲫的性转换效应

试验鱼是人工雌核发育的红鲫。试验结果表明, 喂食 MT_{25} 或 MT_{30} 激素饵料, 能有效地使人工雌核发育红鲫向雄性转化; 喂用 95% Alc. 组饵料也同样有效。已转化成雄性鱼的精巢发育正常, 成为一对长条状的乳白色精巢(图3)。

在停止喂食雄激素饵料和 95% Alc. 组饵料后一个月, MT_{25} 组鱼的平均体长为 8.86 厘米, 平均体重为 15.96 克; MT_{30} 组鱼的平均体长为 10.87 厘米, 平均体重为 25.35 克; 95% Alc. 组鱼的平均

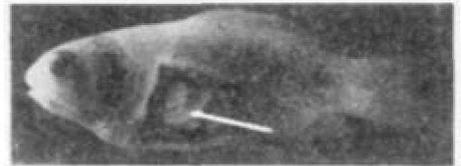


图3. MT_{30} 试验组的人工雌核发育红鲫, ♂性。性腺已转化, 示发育正常的精巢

体长为 8.85 厘米, 平均体重为 15.48 克。经解剖检查, MT_{25} 组有 3 尾雄性鱼, 1 尾雌雄间性鱼; MT_{30} 组有 3 尾雄性鱼, 1 尾雌雄间性鱼; 95% Alc. 组有 6 尾雄性鱼(占 60%), 1 尾雌雄间性鱼, 3 尾为雌性鱼(表 2)。

表 2 MT_{25} 、 MT_{30} 和 95% Alc. 各组的人工雌核发育红鲫的性转换效应

试验日期	试 验 鱼	试验组别	试验鱼数 (尾)	喂养 90 天 后成活鱼数 (尾)	性 别 (尾)		
					♂	♀	♀
1979年	红鲫(♀)×草鱼(♂)的 人工雌核发育子代(F_1)	MT_{25}	40	4	3		1
		MT_{30}	40	4	3		1
		95% Alc.	40	10	6	3	1

由于发现了上述关于 95% Alc. 组饵料具有使雌性异育银鲫或人工雌核发育红鲫性转换成雄性鱼的效应, 于是我们在 1980 年重复了这一实验, 再次取得了肯定的性转换结果。如试验组的异育银鲫已转化为雄性鱼(图4), 精巢形态正常, 未发现有萎缩现象, 镜检精子游动活跃。而对照组的异育银鲫则仍为雌性鱼(图5)。

通过三年(1978—1980)重复试验, 证实 95% 工业酒精具有诱导异育银鲫和人工雌核发育红鲫雄性化的显著效应(表 3)。



图4. 95% Alc. 试验组的异育银鲫, 转化成♂性。示发育正常的精巢。



图5. 对照组, 未加任何处理的异育银鲫, ♀性。示卵巢发育正常

表3 95% Alc. 组的异育银鲫和人工雌核发育红鲫的雄性化效应

试验日期	试验组别	试验鱼	试验鱼数 (尾)	喂养 90 天 后成活鱼数 (尾)	性 别 (尾)			性别类型百分率		
					♂	♀	♀	♂	♀	♀
1978年	95% Alc.	(银鲫♀ × 兴国红鲤♂) F ₁ ♀ × 兴国红鲤♂	40	26	22	4		84.6	15.4	
1979年	95% Alc.	红鲫(♀) × 草鱼(♂ u.v.)	40	10	6	3	1	60	30	10
1980年	95% Alc.	银鲫(♀) × 兴国红鲤♂	40	3	3			100		
	对照组	”	40	10		10			100	

(二) 异育银鲫和人工雌核发育红鲫的雄性化性腺的组织学观察

经过四个多月饲养, 各组鱼体长度均可达到 6.2—11.6 厘米, 性腺也已发育成精巢或卵巢, 在切片中可以看到精子发生的各个时期, 或不同时相的卵母细胞。

在 MT₂₀ 和 95% Alc. 试验组的异育银鲫和人工雌核发育红鲫的雄性化精巢切片中, 可以看到精原细胞, 初级和次级精母细胞, 以及大量精细胞 (图 6、7)。在 MT₂₀ 试验组的人工雌核发育红鲫的雄性化精巢切片中, 除了精子发生的各个时期以外, 还可以看到个别大小不同的椭圆形卵母细胞, 它们被精巢组织所包围, 成为未完全转化成精巢的睾丸卵 (图 8)。而对照组的人工雌核发育红鲫, 在其卵巢切片中, 可以看到不同时相的卵母细胞 (图 9)。因此, 根据性腺组织学切片观察, 也证明每克饵料中含有 25 和 30 微克雄性激素 (MT) 或含有 95% 工业酒精都可诱导雄性化精巢发育成熟, 完成由雌向雄的性转换。

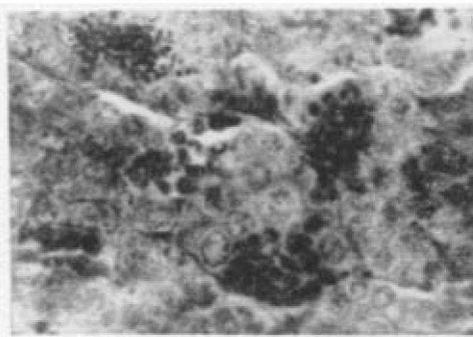


图6 95% Alc. 试验组的雄性化鱼的精巢切片。(方正银鲫♀ × 兴国红鲤♂)(♀) × 兴国红鲤(♂)

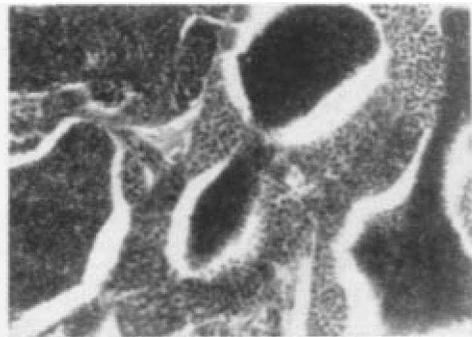


图7 MT₂₀ 试验组的雄性化的人工雌核发育红鲫的精巢切片

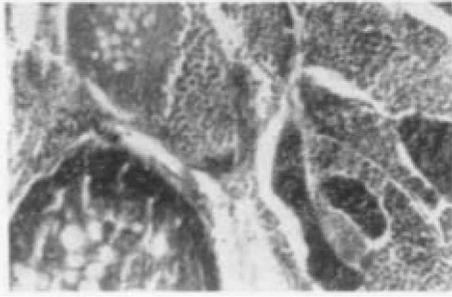


图8 MT_{25} 试验组的未完全雄性化的人工雌核发育红鲫的兼性性腺切片

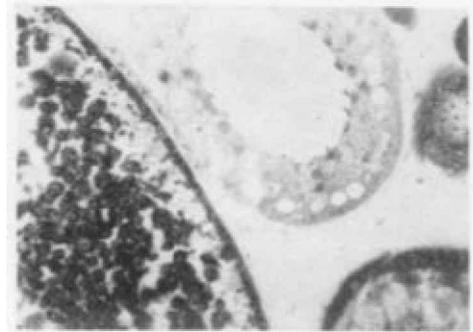


图9 对照组的人工雌核发育红鲫的卵巢切片

讨 论

1. 在鱼类的性转换实验中,国内外都曾指出,甲基睾丸酮的投喂量有一适宜的剂量范围,如果雄激素的剂量过大,其结果是生殖腺萎缩,甚至使雄鱼出现反常的雌性化^[8,9]。Clemens & Inslee (1968)^[6]也曾提到过每克饵料中含有30微克甲基睾丸酮的诱导鱼类性转换的效果最佳,而当甲基睾丸酮浓度增加时效果反而降低。

我们的试验结果也证明类似的情况,如应用 $MT_{50-100\mu g}$ 二组激素饵料处理异育银鲫,不仅不能使异育银鲫向雄性转化,反而引起大部份试验鱼的性腺萎缩,卵巢发育受到抑制。而应用 $MT_{25-30\mu g}$ 二组激素饵料处理人工雌核发育红鲫都能有效地诱导红鲫向雄性转化,性腺也不出现萎缩现象。因此,我们认为,对异育银鲫和人工雌核发育红鲫进行雄性化诱导,甲基睾丸酮的适宜剂量是30微克/克食物(亚剂量是25微克/克食物)。

2. 布鲁姆(Blum, A. 1921, 1923, 1924)^[4]曾用15—20%的酒精注射雌性小白鼠,其交配所生的后代,雄性比率显著提高。布鲁姆还认为,这是因为X型精子对酒精比较敏感,易退化死亡,而Y型精子对酒精不敏感,可以成活所造成的。我们通过三年的重复试验,证明把95%工业酒精拌入饲料,用口服的方法可以使雌核发育的异育银鲫以及人工雌核发育的红鲫向雄性转化,前者的转化率达到86.2%♂,后者为60%♂,而我们解剖了434尾作为对照的雌核发育异育银鲫全为雌性,因此95%工业酒精对于鲫鱼具有雄性化性转换功能是真实存在的,只是其有效成份和作用机制还不了解,也不是布鲁姆的假设所能解说的。

参 考 文 献

- [1] 李璞,1958.关于哺乳类的性别控制。动物学杂志,2(2):104—110。
- [2] 湖北省水产科学研究所,国家水产总局长江水产研究所,1978.莫桑比克罗非鱼性反转实验研究(一)。淡水渔业,2:18—25。
- [3] 郭国民、练慧英,1979.应用甲基睾丸酮诱导莫桑非洲鲫雄性化的研究。遗传,1(6):36—39。
- [4] 蒋一珪等,1982.鲫鱼的人工和天然雌核发育。水生生物学集刊,7(4):29—37。
- [5] 中村 将,1980.ライウピアの雄性ホルモン投与による雄化について。養殖,17(7):84—88。
- [6] Clemens, H. P. & T. Inslee, 1968. The production of unisexual broods by *Tilapia mossambica*

- sexreversed with methyltestosterone. *Trans. Amer. Fish. Society*, 97(I):18—21.
- [7] Yamamoto, T., 1953. Artificially induced sex-reversal in genotypic males of the medaka (*Oryzias Latipes*). *Jour. Exp. Zool.*, 123:571—594.
- [8] Toki-O Yamamoto and Takao Kajishima. 1968. Sex hormone induction of sex reversal in the Goldfish and evidence for male heterogamity. *Jour. Exp. Zool.*, 168:215—221.
- [9] Guerrero, R. D., 1975. Use of Androgens for the production of all male *Tilapia aurea* (steindacher). *Trans. Amer. Fish. Soc.* 104(2):342—348.
- [10] Melchor M. Tayamen & William L. Shelton, 1978. u. s. Inducement of sex reversal in *Sarotherodon niloticus* (Linnaeus). *Aquaculture*, 14(1978)349—354.

STUDY ON THE METHYLTESTOSTERONE INDUCTION OF SEX REVERSAL IN GYNOGENETIC PROGENY OF CRUCIAN CARP

Chen Bende

(*Institute of Hydrobiology, Academia Sinica*)

Abstract

The experiment artificially gynogenetic fries of *Carassius auratus auratus* (red variety) and the naturally gynogenetic ones of *Carassius auratus gibelio*, at the third day after hatching, were administered orally with methyltestosterone (MT) at four different concentrations: 25 μ g, 30 μ g, 50 μ g and 100 μ g per gram of diet. The daily hormone diet, at about 7% as weight of the fry, was divided into two parts to feed at a. m. and p. m. This process was continued for 90 days and thereafter, the hormone-treated fry lived on a normal diet until they reached the stage at which sexing was possible by laparotomy.

The results of experiment were as follows: 1. the fries treated, with MT 25 μ g or MT-30 μ g hormone diet, developed into males except one having a gonad of ovotestis. 2. no males appeared by treating with MT-50 μ g or MT-100 μ g hormone diet. 3. 60—84.6% gynogenetic fries of both kind of fish developed into males while they were daily fed with the diet mixed with 95% crude alcohol (oneml per gram of diet) for a period of 90 days. 4. the gynogenetic fry of the both sexes were fed with a normal diet only they all developed into females.