

文章编号: 1000-0615(2019)04-0801-09

DOI: 10.11964/jfc.20180211170

## 17 $\alpha$ -甲基睾酮对草鱼性腺发育及性类固醇激素水平的影响

姚汶励<sup>1,2</sup>, 姜鹏<sup>1</sup>, 白俊杰<sup>1\*</sup>

(1. 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;  
2. 上海海洋大学, 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306)

**摘要:** 利用养殖草鱼雌性个体所表现出的生长优势, 探讨通过性逆转培育全雌草鱼品种的方法, 具有较好的应用前景。实验采用拌料投喂诱导方式, 在饲料中设置0、50、100和200 mg/kg 4个浓度梯度的17 $\alpha$ -甲基睾酮(MT), 连续投喂150 d, 观测不同处理水平草鱼性腺结构和血液中类固醇激素雌二醇(E<sub>2</sub>)、睾酮(T)和11-酮基睾酮(11-KT)含量的变化规律, 探讨草鱼性逆转过程中的特征变化。性腺的组织切片结果显示, 从投喂30 d开始, 各处理组卵巢中开始出现精原细胞。30~150 d, 50 mg/kg MT处理组草鱼卵母细胞的生成及成熟受到抑制, 发育迟缓; 100 mg/kg MT处理组的生殖细胞受抑制程度要高于50 mg/kg MT处理组, 实验结束时性腺已被大量精原细胞占据, 有向精巢发育的趋势; 200 mg/kg MT处理组精卵兼性状态较50 mg/kg MT处理组明显, 但精原细胞的数量少于100 mg/kg MT处理组, 对照组卵巢未出现精原细胞。血清类固醇激素测定结果显示, 投喂不同剂量的MT, E<sub>2</sub>浓度均显著升高, 于45 d时达到最高值, 之后趋于平稳下降, 但仍显著高于对照组, 未经处理的雄性草鱼, 随着早期精巢的发育, 其E<sub>2</sub>水平也逐渐升高。随着MT投喂时间的延长, 各处理组T浓度分别有不同程度的降低, 45 d时各处理组降幅最大, 且与MT浓度呈正相关, 11-KT则有不同程度升高。研究表明, 100 mg/kg MT为其性逆转较适宜的浓度, MT可使早期雌性草鱼血清E<sub>2</sub>升高, 发挥雄激素效应, 从而促进卵巢卵细胞退化, 精原细胞增殖。

**关键词:** 草鱼; 17 $\alpha$ -甲基睾酮; 性腺发育; 性类固醇激素

**中图分类号:** Q 954.4; S 965.112

**文献标志码:** A

草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)是我国重要的大宗淡水经济养殖鱼类, 2016年产量高达589.89万t, 占淡水养殖鱼类年产量的21%<sup>[1]</sup>。虽然草鱼养殖产量常年稳居首位, 但良种缺乏问题却长期困扰着其产业的健康可持续发展, 良种选育与创新研究亟待突破。有研究表明, 草鱼雌性个体在大规格养殖阶段要比雄鱼的体质量高出10%以上<sup>[2]</sup>。利用草鱼这一生长优势, 如果将遗传型XX雌鱼与XX生理型雄鱼配对繁殖, 生产全雌草鱼苗种, 可为开发快长草鱼新品种提供新途径。其中, 通过性逆转技术获得XX生理型雄

性草鱼是实施该育种策略的关键环节<sup>[3]</sup>。

17 $\alpha$ -甲基睾酮(17 $\alpha$ -methyltestosterone, MT)具有促进和维持雄性器官发育, 诱导精子发生与释放的功能, 在水产养殖中通常作为诱导雌鱼雄性化的性诱导剂<sup>[4-6]</sup>。在性逆转过程中, 不同鱼类对MT的吸收与利用能力存在差异。有研究采用10 mg/kg MT, 可成功诱导牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)幼鱼性逆转<sup>[7]</sup>, 同等浓度的MT也可使4月龄的欧洲鲈(*Dicentrarchus labrax*)雄性化<sup>[8]</sup>; 性逆转尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)鱼苗最适MT浓度是60 mg/kg, 低于这一浓度雄性率降低<sup>[9]</sup>; 莫桑比

收稿日期: 2018-02-02 修回日期: 2018-06-15

资助项目: 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-45-04, CARS-46-03); 广东省自然科学基金(2015A030313702)

通信作者: 白俊杰, E-mail: jjbai@163.net

克罗非鱼(*O. mossambicus*)在30 mg/kg MT时就可以完全性逆转<sup>[10]</sup>,但投喂时间过短会降低雄性率<sup>[11]</sup>。虹鳉(*Poecilia reticulata*)、茉莉花鱗(*P. latipinna*)等花鱗科(Poeciliidae)鱼类最适MT浓度为90 mg/kg<sup>[12]</sup>,鲤科(Cyprinidae)激素处理的强度要高于花鱗科<sup>[13]</sup>。因此,选择合适的激素浓度是成功诱导性逆转的必要条件。

性类固醇激素在硬骨鱼类生殖、发育等方面发挥重要的生理调节作用,血清中性类固醇激素的变化常被作为MT诱导遗传雌性个体向雄性转化的观测指标。其中雄激素主要为睾酮(testosterone, T)和11-酮基睾酮(11-ketotestosterone, 11-KT),雌激素主要为雌二醇(estradiol-17 $\beta$ , E<sub>2</sub>)<sup>[14-15]</sup>。在草鱼性逆转过程中,性类固醇激素的研究尚未见报道。本实验利用不同浓度MT拌料投喂诱导草鱼雄性化,通过观测不同浓度处理水平性腺结构变化特点,筛选MT投喂诱导草鱼性逆转的最适浓度,同时监测血液性类固醇激素的变化规律,以期为全雌草鱼新品种的创制提供技术支持。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验对象

实验草鱼来自中国水产科学研究院珠江水产研究所实验基地,养至4月龄时,从群体中随机挑选600尾规格一致[(20.00 $\pm$ 4.33) g, (12.34 $\pm$ 0.90) cm]的健康个体。

### 1.2 主要试剂

17 $\alpha$ -甲基睾酮购自Sigma公司,基因组DNA提取试剂盒购自广州美基生物科技有限公司,2 $\times$  PCR Solution Premix Taq<sup>TM</sup> (TaKaRa Taq<sup>TM</sup> Version 2.0)购自TaKaRa宝生物工程(大连)有限公司。睾酮和雌二醇放射免疫分析试剂盒购自北京北方生物技术研究 所,11-酮基睾酮酶联免疫分析试剂盒购自Cayman公司。

### 1.3 甲基睾酮饵料的配制与饲养管理

甲基睾酮拌料采用El-Greisy等<sup>[9]</sup>的乙醇喷雾法处理,按照50、100、200 mg/kg梯度剂量(简称50 MT、100 MT、200 MT)称取所需MT溶于一定剂量95%的乙醇中,充分溶解后均匀喷洒在饲料上,置于40 $^{\circ}$ C烘箱烘4 h;对照组饲料用未添加MT的95%乙醇做同样处理。所有饵料避光干燥

保存。

实验鱼按投喂饲料MT浓度梯度设置分为4组,每组150尾,分别置于约10 m<sup>2</sup>户外水泥池中饲养。投喂实验从2016年11月开始至2017年4月结束,连续饲养周期150 d。实验期间,气泵不间断充气,每周换水清污1次,换水量约为1/3。每天9:00 am和4:30 pm各投喂1次,日投喂量约为鱼体质量的3%,以每次投喂后无残饵为宜。药饵停止投喂后,所有处理组改用普通颗粒饲料继续投喂。

### 1.4 遗传性别鉴定

取草鱼新鲜鳍条组织提取基因组DNA,利用Wang等<sup>[16]</sup>开发的草鱼雌雄特异性引物进行PCR扩增,鉴别草鱼遗传性别(雄性个体扩增单一产物条带,雌性无产物)。PCR扩增的反应程序为95 $^{\circ}$ C预变性4 min;95 $^{\circ}$ C变性30 s,56 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸30 s,共30个循环;72 $^{\circ}$ C延伸5 min。

### 1.5 性腺组织学观察

实验组分别于第5、30、150和210天取血后随即挑出性腺(性腺中部)用Bouin氏液固定。经固定24 h后酒精梯度脱水、二甲苯透明、石蜡包埋,切片厚度6~8  $\mu$ m,苏木精—伊红(H.E)染色,用Leica DM2500显微镜观察并拍照。每个处理组各阶段选取5尾草鱼用于制作性腺石蜡切片。

### 1.6 血清中性类固醇激素的测定

实验于投喂第5、30、45、60、100、150和210天进行样品采集。随机挑选实验组雌鱼及对照组雄鱼各3~5尾测体质量、体长,用1 mL注射器尾静脉采血,4 $^{\circ}$ C静置2 h后,以3 000 r/min离心15 min,血清-80 $^{\circ}$ C保存,用于性类固醇激素的测定。

T和E<sub>2</sub>的含量测定采用竞争放射免疫分析法,原理是将待测血清抗原(E<sub>2</sub>或T)和定量的放射性抗原(<sup>125</sup>I-E<sub>2</sub>或<sup>125</sup>I-T)共同与限量抗体竞争性结合,形成抗原—抗体复合物,测定复合物的放射性活性,并通过绘制标准曲线,计算得到的血清中E<sub>2</sub>、T的含量。

11-KT的含量测定采用竞争酶联免疫分析法,原理是将待测血清抗原(11-KT)和酶标抗原(11-KT-AChe)共同与特异性抗体竞争结合,形成抗原—

抗体复合物, 通过底物显色反应测定复合物的吸光度(412 nm), 并通过绘制标准曲线, 计算得到血清中11-KT的含量。

### 1.7 数据处理

实验数据用平均值 $\pm$ 标准误表示, 结果用SPSS 22.0软件进行统计分析, 在使用One-Way ANOVA进行方差分析的基础上采用Duncan氏多重比较检验组间差异, 实验以 $P < 0.05$ 表示差异显著。

## 2 结果

### 2.1 饲料中添加不同浓度17 $\alpha$ -MT对草鱼性腺发育的影响

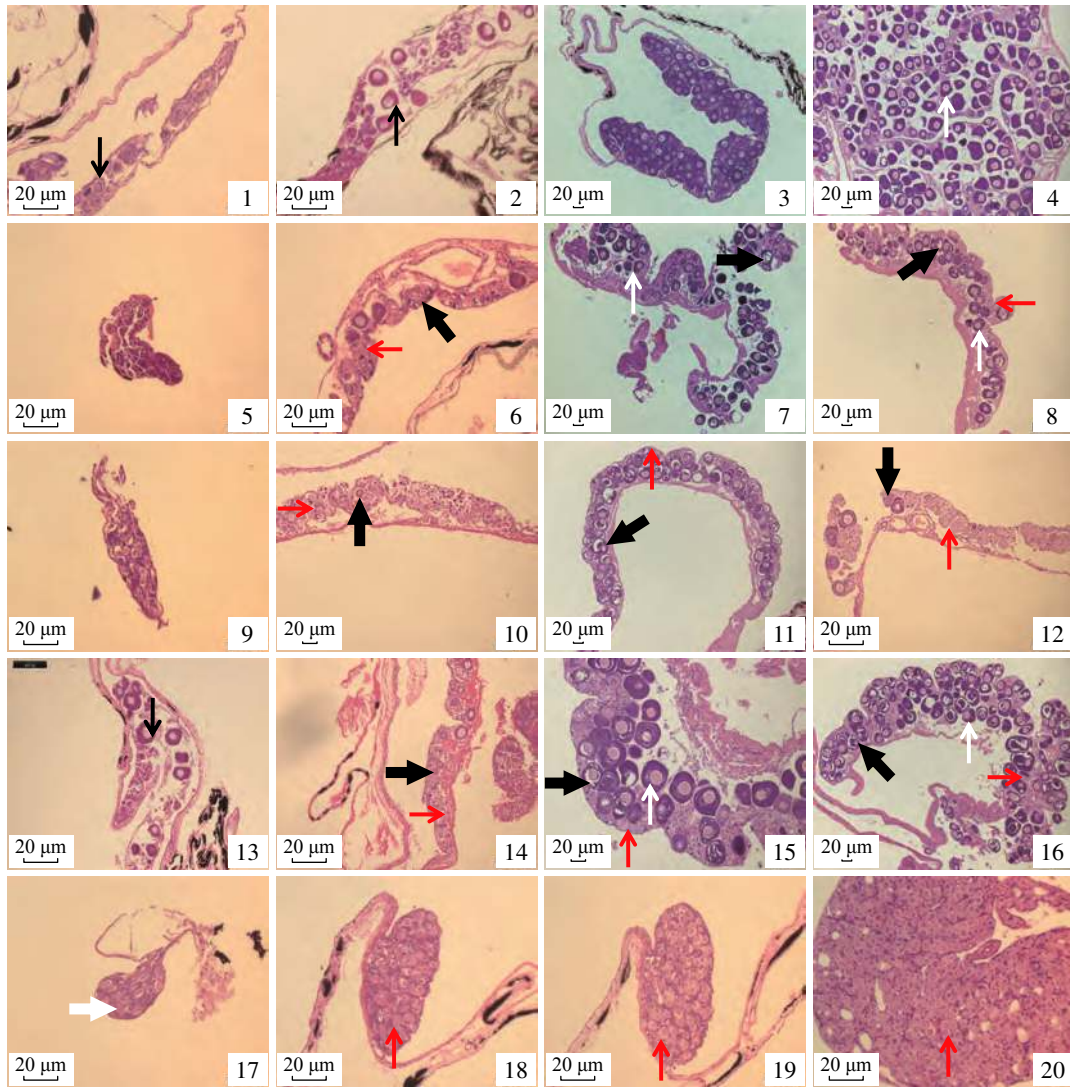
经PCR鉴定草鱼遗传性别, 再进行组织学切片观察, 参照刘筠等<sup>[7]</sup>方法对草鱼性腺分期(表1,

图版)。随着投喂时间的延长, 对照组雌鱼由最初的卵原细胞有丝分裂为I期卵母细胞, 并逐渐发育至卵母细胞II期。对照组雄鱼由最初的原始生殖细胞发育为精原细胞, 增殖分裂至精母细胞II期。药饵投喂期间, 50 MT和100 MT处理组投喂开始5 d时均出现了生殖细胞减少(图版-5, 9)。30~150 d时, 50 MT处理组卵母细胞的生成及成熟受到抑制, 卵母细胞退化加剧, 发育迟缓, 出现精卵共存现象(图版-6, 7)。100 MT处理组精原细胞数目显著增多(图版-10, 11)。210 d时, 50 MT精卵共存现象更加明显(图版-8), 100 MT处理组被大量精原细胞占据, 有向精巢发育的趋势(图版-12)。而200 MT处理组精巢的成熟度较低, 各时期均存在成熟的卵母细胞, 即使在精卵共存的性腺中精原细胞发育依然较好(图版-13, 14, 15)。210 d时, 200 MT处理组精卵共存

表 1 饲料中添加不同浓度17 $\alpha$ -MT对草鱼性腺发育的影响

Tab. 1 Effects of different concentrations of 17 $\alpha$ -MT on gonadal development of *C. idella*

组别 group	处理时间/d processing time	组织学观察结果 histological observation of gonadal development
对照组雌鱼(CF) control female	5	卵原细胞(图版-1)
	30	I期卵母细胞(图版-2)
	150	I期、II期卵母细胞(图版-3)
	210	II期卵母细胞(图版-4)
50 MT	5	卵原细胞减少(图版-5)
	30	I期卵母细胞减少, 开始出现精原细胞(图版-6)
	150	I期、II期卵母细胞退化, 精卵共存(图版-7)
	210	II期卵母细胞退化, 精卵共存(图版-8)
100 MT	5	卵原细胞减少(图版-9);
	30	无I期卵母细胞, 开始出现精原细胞(图版-10)
	150	卵母细胞严重退化, 精原细胞增多(图版-11)
	210	卵母细胞极少, 存在大量精原细胞(图版-12)
200 MT	5	卵原细胞发育成熟(图版-13)
	30	I期卵母细胞减少, 开始出现精原细胞(图版-14)
	150	II期卵母细胞、退化卵母细胞及精原细胞共存(图版-15)
	210	II期卵母细胞裂解加剧, 精卵共存(图版-16)。
对照组雄鱼(CM) control male	5	原始生殖细胞(图版-17)
	30	精原细胞(图版-18)
	150	I期精母细胞(图版-19)
	210	I期、II期精母细胞(图版-20)



图版 饲料中添加不同浓度MT对草鱼性腺组织结构的影响

1~4和17~20分别表示普通对照草鱼卵巢及精巢在5 d、30 d、150 d及210 d组织形态变化。5~8, 9~12及13~16分别表示草鱼卵巢在50 MT、100 MT及200 MT处理下5 d、30 d、150 d及210 d组织形态变化。其中黑细箭头表示卵原细胞, 白色细箭头表示卵母细胞, 红色细箭头表示精原细胞, 黑粗箭头表示退化的卵母细胞, 白粗箭头表示原始生殖细胞

Plate Effects of different concentrations of MT in feed on gonadal histology of *C. idella*

Histological examination of 1-4, 17-20 show the changes of normal grass carp ovary and testes at 5 d, 30 d, 150 d and 210 d respectively. Histological examination of 5-8, 9-12 and 13-16 indicates the damage degree in grass carp ovaries after 50 MT, 100 MT and 200 MT treatments at 5 d, 30 d, 150 d, and 210 d, respectively. Among them, the black arrow indicates oogonia, the white arrow indicates oocytes, the red arrow indicates spermatogonia, the black arrow indicates apoptosis oocytes, and the white arrow indicates primordial germ cells

现象较50 MT处理组明显, 但雄性化现象低于100 MT处理组(图版-16)。

2.2 饲料中添加不同浓度17α-MT对血清中性类固醇激素的影响

17α-MT对血清中睾酮的影响 MT对血清中T的影响结果表明, 经过7个月的饲喂, 对照组雌雄草鱼T含量无显著差异(P>0.05), 各时期雄鱼的T含量均略高于雌鱼。药饵处理45 d时,

3个处理组T含量显著低于对照组(P<0.05), 随着E<sub>2</sub>处理浓度的升高T浓度降幅越显著, 其中200 MT组T含量最低。100~150 d时, T含量变化规律为对照组雄鱼>100 MT>对照组雌鱼>50 MT>200 MT, 200 MT组T含量显著低于对照组雄鱼(P<0.05)。实验结束时, 处理组T含量与对照组均无显著差异(P>0.05)(图1)。

17α-MT对血清中E<sub>2</sub>的影响 MT对血清中E<sub>2</sub>的影响结果表明, 药饵投喂期间, 对照组

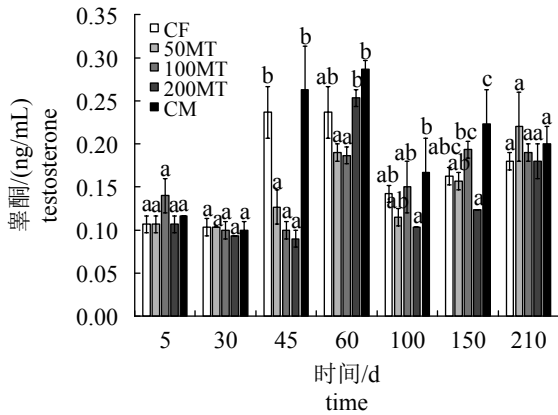


图 1 投喂不同浓度17 $\alpha$ -MT对血清中睾酮的影响

同一时期内处理间不同字母标记表示差异显著( $P < 0.05$ ), 下同

Fig. 1 Effect of different concentrations of 17 $\alpha$ -MT on testosterone in serum

The different letters between the treatments in the same period show significant difference ( $P < 0.05$ ), the same below

雌雄草鱼E<sub>2</sub>含量无显著差异( $P > 0.05$ ), 实验结束时, 雄鱼E<sub>2</sub>含量显著高于雌鱼。随着MT投喂浓度的增加, 各处理组血清中E<sub>2</sub>的含量在药饵投喂前60 d均显著升高( $P < 0.05$ ), E<sub>2</sub>的上升幅度与MT浓度呈正比, 其中45 d时各处理组的E<sub>2</sub>均增加至最大值, 之后平稳下降, 但仍显著高于对照组(图2)。实验结束时, E<sub>2</sub>浓度从高到低依次为对照组雄鱼>200 MT>100 MT>对照组雌鱼>50 MT。

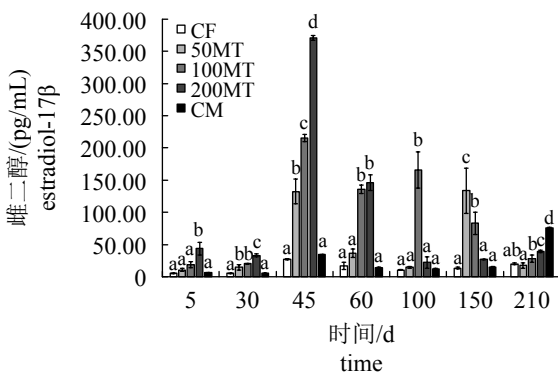


图 2 投喂不同浓度17 $\alpha$ -MT对血清中雌二醇的影响

Fig. 2 Effect of different concentrations of 17 $\alpha$ -MT on estradiol in serum

17 $\alpha$ -MT对血清中11-KT的影响 MT对血清中11-KT的影响结果显示, 经过210 d的饲喂, 对照组雌雄草鱼11-KT含量随着投喂时间的延长逐渐上升, 但二者均无显著差异( $P > 0.05$ ), 实验

后期, 雄鱼11-KT浓度高于雌鱼。药饵投喂期间, 50 MT、100 MT、200 MT的11-KT浓度分别在45、5、60 d时显著升高( $P < 0.05$ ), 而其余各组与对照组雌鱼均无显著差异( $P > 0.05$ )(图3)。

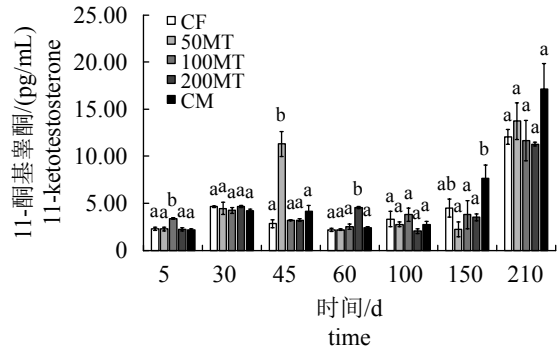


图 3 投喂不同浓度17 $\alpha$ -MT对血清中11-酮基睾酮的影响

Fig. 3 Effect of different concentrations of 17 $\alpha$ -MT on 11-keto testosterone in serum

### 3 讨论

鱼类性腺发育受内源性激素的影响<sup>[18-19]</sup>, 而外源激素MT则会影响卵巢的进一步发育。本实验结果显示, 从药饵饲喂30 d到实验结束时, 50~200 MT各处理组性腺分化时间并不同步, 且在一定时间段内出现了雌雄同体的现象, 而对照组卵巢则没有出现这种变化, 从而证实, 投喂MT能有效诱导草鱼雄性化。100 MT处理组实验结束时性腺已被大量精原细胞占据, 性逆转趋势明显。斑马鱼(*Danio rerio*)在同样的激素浓度下也被成功性逆转<sup>[20]</sup>。性逆转卵巢结构变化过程: 性逆转初期, 精原细胞增殖; 至性逆转中期, 精原细胞和退化的卵母细胞共存; 随着性逆转发展, 精原细胞和精母细胞成为性腺中的优势细胞。这一变化规律与赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*)<sup>[21]</sup>性逆转过程变化一致。50 MT处理组各时期均存在正常的卵母细胞, 这可能是因为MT处理浓度低, 未能完全阻止基因型雌性草鱼个体在早期成熟阶段产生卵母细胞<sup>[9]</sup>。200 MT处理组虽处于高浓度处理, 但各时期均出现成熟的卵母细胞, 这可能是MT的雌激素效应引起的。在斑马鱼中已证实MT雌激素效应与雄激素效应<sup>[22]</sup>, 它具有促进雄性化和卵巢发育的功能, 这被称为“MT自相矛盾的雌性化”<sup>[23-25]</sup>。

$E_2$ 能启动卵巢分化,调控卵母细胞发育成熟过程,是雌激素中最主要、活性最强的激素<sup>[26]</sup>。已有研究表明,抑制 $E_2$ 的合成是罗非鱼雄性化的必要条件<sup>[27-28]</sup>。而李广丽等<sup>[21]</sup>发现用雄激素MT诱导赤点石斑鱼性逆转过程中, $E_2$ 浓度无显著变化。本实验结果显示,MT能显著提高雌性草鱼体内 $E_2$ 水平。从体内代谢途径可知,T为 $E_2$ 的前体物质,随着药饵投喂时间的延长,各处理组T浓度不同程度地降低。对雌性鲮(*Mugil cephalus*)<sup>[29]</sup>与雌性日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)<sup>[30]</sup>用MT处理也观察到类似T含量降低的现象。而Ijiri等<sup>[31]</sup>和Tsai等<sup>[32]</sup>认为MT通过上调芳香化酶活性,促使T被芳香化为 $E_2$ ,基于本实验 $E_2$ 浓度升高,推测T降低是被芳香化酶催化的结果。已有研究证明,斑马鱼体内 $E_2$ 水平的升高会抑制卵巢的发育<sup>[33]</sup>。在稀有鮎鲫(*Gobiocypris rarus*)的研究中,100  $\mu\text{g/L}$  MT可以使雌鱼 $E_2$ 含量显著升高<sup>[34]</sup>,出现雄性化<sup>[35]</sup>,而 $E_2$ 作为雌激素对卵母细胞成熟的影响一直存在争议。在太平洋鲑(*Gadus macrocephalus*)<sup>[36]</sup>、斑点叉尾鲟(*Ictalurus punctatus*)<sup>[37]</sup>、埃及胡子鲶(*Clarias gariepinus*)<sup>[38]</sup>的研究中 $E_2$ 与卵母细胞卵黄大量积累正相关。相反,本实验生理学与组织学显示,各处理组高浓度 $E_2$ 与卵母细胞的早期成熟呈明显负相关,这与对黄鳍(*Monopterus albus*)的研究结果一致<sup>[39]</sup>。近年来,已有研究证明 $E_2$ 的雄激素效应,在对啮齿类的研究中发现,雌激素在精子发生中起着重要的作用,提出了将雌激素物质看作为“雄性激素”的新概念<sup>[40]</sup>。Miura等<sup>[41-42]</sup>使用离体精巢悬浮器官培养系统来揭示类固醇激素诱发鳗鲡精子发生的内分泌机制,研究结果有力地证明了精原干细胞的更新受天然雌激素 $E_2$ 的调节,而11-KT则起诱导和促进作用,并认为 $E_2$ 在精子发生早期是一种不可缺少的“雄激素”。在对青鳉(*Oryzias latipes*)<sup>[43]</sup>和鲮<sup>[44]</sup>的研究中,也发现适宜浓度 $E_2$ 能刺激早期精原干细胞增殖。本实验中,对照组雄鱼随着早期草鱼精巢发育成熟, $E_2$ 水平逐渐上升。由此推测草鱼性腺发育早期, $E_2$ 具有雄激素效应, $E_2$ 浓度的升高有助于雌草鱼的雄性化。

综上所述,雌雄草鱼性腺发育早期,血清中均存在一定浓度的T、 $E_2$ 和11-KT, $E_2$ 浓度的变化可以作为MT摄入量的生理指示。本研究推测在草鱼性腺发育早期阶段,一定浓度的 $E_2$ 可以诱导精原细胞的发生,100 mg/kg MT为草鱼性逆转较适宜的浓度。

#### 参考文献:

- [1] 农业部渔业渔政管理局. 中国渔业年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2017.  
Fisheries Bureau of the Ministry of Agriculture. China fisheries yearbook[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2017(in Chinese).
- [2] 姜鹏, 韩林强, 白俊杰, 等. 草鱼生长性状的遗传参数和育种值估计[J]. 中国水产科学, 2018, 25(1): 18-25.  
Jiang P, Han L Q, Bai J J, et al. Estimation of genetic parameters and breeding values for growth traits in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2018, 25(1): 18-25(in Chinese).
- [3] Shelton W L. Broodstock development for monosex production of grass carp[J]. Aquaculture, 1986, 57(1-4): 311-319.
- [4] 楼允东. 鱼类性别控制研究的进展[J]. 上海水产大学学报, 1992, 1(3-4): 168-173.  
Lou Y D. Progress on research of sex control in fish[J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 1992, 1(3-4): 168-173(in Chinese).
- [5] 方永强, 李正森. 17 $\alpha$ -甲基睾酮对淡水和海水鲮鱼精子发生的比较[J]. 台湾海峡, 1992, 11(4): 301-304.  
Fang Y Q, Li Z S. Comparison of 17 $\alpha$ -methyltestosterone on spermatogenesis in grey mullet of fresh water and seawater[J]. Journal of Oceanography in Taiwan Strait, 1992, 11(4): 301-304(in Chinese).
- [6] Yamamoto T O. 3 sex differentiation[J]. Fish Physiology, 1969, 3: 117-175.
- [7] Kitano T, Takamune K, Nagahama Y, et al. Aromatase inhibitor and 17 $\alpha$ -methyltestosterone cause sex-reversal from genetical females to phenotypic males and suppression of P450 aromatase gene expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. Molecular Reproduction & Development, 2000, 56(1): 1-5.
- [8] Blázquez M, Piferrer F, Zanuy S, et al. Development of sex control techniques for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) aquaculture: effects of dietary 17 $\alpha$ -methyltestosterone prior to sex differentiation[J]. Aquaculture, 1995, 135(4): 329-342.
- [9] El-Greisy Z A, El-Gamal A E. Monosex production of tilapia, *Oreochromis niloticus* using different doses of 17 $\alpha$ -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.
- [10] Guerrero R D I. Culture of male tilapia *O. mossambica*

- produced through artificial sex reversal[J]. *Advances in Aquaculture*, 1976.
- [11] Macintosh D J, Varghese T J, Satyanarayana G P R. Hormonal sex reversal of wild-spawned tilapia in India[J]. *Journal of Fish Biology*, 1985, 26(2): 87-94.
- [12] 郑曙明, 陈章宝, 贺蓉. 甲基睾酮对孔雀鱼、玛丽鱼性逆转的试验[J]. *四川动物*, 1997, 16(4): 183-185.
- Zheng S M, Chen Z B, He R. The sex reversal of methyltestosterone against Guppies and Mariposities[J]. *Sichuan Journal of Zoology*, 1997, 16(4): 183-185(in Chinese).
- [13] Pandian T J, Sheela S G. Hormonal induction of sex reversal in fish[J]. *Aquaculture*, 1995, 138(1-4): 1-22.
- [14] Zheng Y, Chen J Z, Liu Y, *et al.* Molecular mechanism of endocrine system impairment by 17 $\alpha$ -methyltestosterone in gynogenetic Pengze crucian carp offspring[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2016, 128: 143-152.
- [15] Devlin R H, Nagahama Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences[J]. *Aquaculture*, 2002, 208(3-4): 191-364.
- [16] Wang Y P, Lu Y, Zhang Y, *et al.* The draft genome of the grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) provides insights into its evolution and vegetarian adaptation[J]. *Nature Genetics*, 2015, 47(6): 625-631.
- [17] 刘筠, 刘素嫫, 寿孝钟, 等. 草鱼性腺发育的研究[J]. *湖南师范大学自然科学学报*, 1962(4): 65-87, 89-98.
- Liu J, Liu S L, Shou X Z, *et al.* The research of grass carp gonad development[J]. *Journal of Natural Science of Hunan Normal University*, 1962(4): 65-87, 89-98(in Chinese).
- [18] 徐永江, 柳学周, 王清印, 等. 半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)血浆性类固醇激素表达与卵巢发育及温光调控的关系研究[J]. *海洋与湖沼*, 2011, 42(1): 67-74.
- Xu Y J, Liu X Z, Wang Q Y, *et al.* Relationships between serum sex steroids levels and gonadal development and photothermal regulation during the annual maturation of captive *Cynoglossus semilaevis* Günther[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2011, 42(1): 67-74(in Chinese).
- [19] 洪万树, 吴秋艳, 张其永. 中华乌塘鳢血清性类固醇激素含量与性腺发育的关系及其季节变化[J]. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2009, 48(2): 274-277.
- Hong W S, Wu Q Y, Zhang Q Y. Changes of serum sex steroids levels with gonadal development and seasons in *Bostrichthys sinensis*[J]. *Journal of Xiamen University (Natural Science Edition)*, 2009, 48(2): 274-277(in Chinese).
- [20] 张立涛. 斑马鱼早期性腺发育及甲基睾酮对其性分化的影响[D]. 保定: 河北大学, 2010.
- Zhang L T. Development of gonad at early stages in zebrafish (*Danio rerio*) and effects of MT on its sex differentiation[D]. Baoding: Hebei University, 2010(in Chinese).
- [21] 李广丽, 刘晓春, 林浩然. 17 $\alpha$ -甲基睾酮对赤点石斑鱼性逆转的影响[J]. *水产学报*, 2006, 30(2): 145-150.
- Li G L, Liu X C, Lin H R. Effects of 17 $\alpha$ -methyltestosterone on sex reversal in red-spotted grouper, *Epinephelus akaara*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2006, 30(2): 145-150(in Chinese).
- [22] Fenske M, Segner H. Aromatase modulation alters gonadal differentiation in developing zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Aquatic Toxicology*, 2004, 67(2): 105-126.
- [23] Rinchar J, Dabrowski K, Garcia-Abiado M A, *et al.* Uptake and depletion of plasma 17 $\alpha$ -methyltestosterone during induction of masculinization in muskellunge, *Esox masquinongy*: effect on plasma steroids and sex reversal[J]. *Steroids*, 1999, 64(8): 518-525.
- [24] Örn S, Holbech H, Madsen T H, *et al.* Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone[J]. *Aquatic Toxicology*, 2003, 65(4): 397-411.
- [25] Zerulla M, Länge R, Steger-Hartmann T, *et al.* Morphological sex reversal upon short-term exposure to endocrine modulators in juvenile fathead minnow (*Pimephales promelas*)[J]. *Toxicology Letters*, 2002, 131(1-2): 51-63.
- [26] 蒋小龙. 性类固醇激素在尼罗罗非鱼性别决定与分化中的作用[D]. 重庆: 西南大学, 2014.
- Jiang X L. Effects of sex steroids on sex determination and differentiation of Nile tilapia[D]. Chongqing: Southwest University, 2014(in Chinese).
- [27] Wassermann G J, Afonso L O B. Sex reversal in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus) by androgen immersion[J]. *Aquaculture Research*, 2003, 34(1): 65-71.
- [28] Bhandari R K, Nakamura M, Kobayashi T, *et al.* Suppression of steroidogenic enzyme expression during androgen-induced sex reversal in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to androgen[J]. *Journal of Endocrinology*, 2005, 166(2): 185-192.

- omis niloticus*][J]. General and Comparative Endocrinology, 2006, 145(1): 20-24.
- [29] Tamaru C S, Kelley C D, Lee C S, *et al.* Effects of chronic LHRH-a+17 $\alpha$ -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.
- [30] 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 $\beta$ -雌二醇含量的影响[J]. 水产学报, 2001, 25(2): 107-111.
- Zhang L H, Zhang W M, Lin H R. Effects of 4-androstene-3, 17-dione and 17 $\alpha$ -methyl-testosterone on testosterone and 17 $\beta$ -estradiol levels in the serum of *Anguilla japonica*[J]. Journal of Fisheries of China, 2001, 25(2): 107-111(in Chinese).
- [31] Ijiri S, Kazeto Y, Takeda N, *et al.* Changes in serum steroid hormones and steroidogenic ability of ovarian follicles during artificial maturation of cultivated Japanese eel, *Anguilla japonica*[J]. Aquaculture, 1995, 135(1-3): 3-16.
- [32] Tsai C L, Wang L H, Chang C F, *et al.* Effects of gonadal steroids on brain serotonergic and aromatase activity during the critical period of sexual differentiation in tilapia, *Oreochromis mossambicus*[J]. Journal of Neuroendocrinology, 2000, 12(9): 894-898.
- [33] Kwon B, Shin H, Moon H B, *et al.* Effects of tris (2-butoxyethyl) phosphate exposure on endocrine systems and reproduction of zebrafish (*Danio rerio*)[J]. Environmental Pollution, 2016, 214: 568-574.
- [34] 刘少贞, 吕晓也, 高广斌, 等. 17 $\alpha$ -甲基睾酮对稀有鮡体内激素水平的影响[J]. 畜牧与饲料科学, 2016, 37(6-7): 1-3.
- Liu S Z, Lü X Y, Gao G B, *et al.* Effect of 17 Alpha-methyl testosterone (MT) on hormone levels of *Gobiocypris rarus*[J]. Animal Husbandry and Feed Science, 2016, 37(6-7): 1-3(in Chinese).
- [35] 刘阿朋, 查金苗, 王子健, 等. 17 $\alpha$ -甲基睾酮对稀有鮡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.
- Liu A P, Zha J M, Wang Z J, *et al.* Influences of 17 $\alpha$ -methyltestosterone on gonad development and plasma vitellogenin induction of rare minnow larva[J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2006, 1(3): 254-258(in Chinese).
- [36] 李兴源. 太平洋鳕繁殖生理与性激素受体在性腺组织中的定位研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.
- Li X Y. Studies on the function of the reproductive and the immunohistochemical on the gonad in *Gadus macrocephalus*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014(in Chinese).
- [37] MacKenzie D S, Thomas P, Farrar S M. Seasonal changes in thyroid and reproductive steroid hormones in female channel catfish (*Ictalurus punctatus*) in pond culture[J]. Aquaculture, 1989, 78(1): 63-80.
- [38] Richter C J J, Eding E H, Goos H J T, *et al.* The effect of pimozide/LHRHa and 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone on plasma steroid levels and ovulation in the African catfish, *Clarias gariepinus*[J]. Aquaculture, 1987, 63(1-4): 157-168.
- [39] 宋平, 熊全沫. 黄鳝血清睾酮和雌二醇含量周年变化规律的研究[J]. 武汉大学学报(自然科学版), 1993(2): 115-120.
- Song P, Xiong Q M. The annual cycle of serum estradiol and testosterone in spontaneous sex-reversing fish *Monopterus albus* (Zuiew)[J]. Journal of Wuhan University (Natural Science Edition), 1993(2): 115-120(in Chinese).
- [40] O'Donnell L, Robertson K M, Jones M E, *et al.* Estrogen and spermatogenesis[J]. Endocrine Reviews, 2001, 22(3): 289-318.
- [41] Miura T, Miura C. Japanese eel: a model for analysis of spermatogenesis[J]. Zoological Science, 2001, 18(8): 1055-1063.
- [42] Miura T, Miura C, Ohta T, *et al.* Estradiol-17 $\beta$  stimulates the renewal of spermatogonial stem cells in males[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1999, 264(1): 230-234.
- [43] Song M, Gutzeit H O. Primary culture of medaka (*Oryzias latipes*) testis: a test system for the analysis of cell proliferation and differentiation[J]. Cell and Tissue Research, 2003, 313(1): 107-115.
- [44] 宋海霞, 翁幼竹, 方永强. 17 $\beta$ -雌二醇对鳊早期精子发生的影响及其作用机制[J]. 中国水产科学, 2009, 16(5): 712-717.
- Song H X, Weng Y Z, Fang Y Q. Effects and mechanism of estradiol-17 $\beta$  on early spermatogenesis of grey mullet, *Mugil cephalus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16(5): 712-717(in Chinese).



## Effects of 17 $\alpha$ -methyltestosterone on gonadal development and hormone levels in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)

YAO Wenli<sup>1,2</sup>, JIANG Peng<sup>1</sup>, BAI Junjie<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fishery Resource Application & Cultivation,  
Ministry of Agriculture and Rural Affairs,

Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;

2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education,  
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** By using the growth superiority demonstrated by the female individuals of the cultured grass carp, the method of breeding the whole female grass carp species by sex reversal is discussed, which has a good application prospect. The 17 $\alpha$ -methyltestosterone (17 $\alpha$ -MT) was selected to induce female-to-male as the male hormone, and set 4 concentration gradients evenly mixed with feed, i.e. 0 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg, 200 mg/kg, which were respectively fed for 150 days. The objective of this study was to investigate the effects of different MT-treated diet on gonadal development and the changes of estradiol-17 $\beta$  (E<sub>2</sub>), testosterone (T) and 11-ketotestosterone (11-KT), and further the characteristics in the process of grass carp sex reversal. The morphological changes of grass carp were investigated by observing the changes of gonadal structure and serum steroid hormone content at different treatment levels to explore the sex reversal. Histological sections of gonads results showed that spermatogonia began to appear in the ovaries of all treatment groups from the 30 th day after feeding. With the prolongation of feeding time, 50 mg/kg MT treatment group can inhibit the formation and maturation of oocytes, resulting in developmental delay; The inhibition of germ cells in 100 mg/kg MT treatment group was higher than that in 50 mg/kg MT treatment group, the gonads had been occupied by a large number of spermatogonia, and there was a tendency of developing testis at 210 d. The ovaries-testes state of 200 mg/kg MT treatment group at 210 d was more obvious than 50 mg/kg MT treatment group, but the number of spermatogonia was less than 100 mg/kg MT treatment group, while the control group ovary did not exhibit spermatogonia. The results of serum steroid hormone revealed that E<sub>2</sub> increased significantly which to some extent depended on the MT dosages, reached the highest value at 45 days and then decreased steadily, but was still significantly higher than that of the control group, however. With the development of early stage testis, E<sub>2</sub> level of control male also gradually increased. With the prolongation of MT feeding time, the concentrations of T in each treatment group decreased to different extents, and the biggest drop occurred in all treatment groups at 45 days, which was positively correlated with the MT concentration. The 11-KT increased to varying degrees. The results show that: 100 mg/kg was more suitable concentration to bring about sex reversal, MT can cause the early female fish serum E<sub>2</sub> to increase, and exert the effect of androgen, thereby promoting ovarian egg cell degradation, and spermatogonia proliferation.

**Key words:** *Ctenopharyngodon idella*; 17 $\alpha$ -methyltestosterone; gonadal development; sex steroid hormone

**Corresponding author:** BAI Junjie. E-mail: jjbai@163.net

**Funding projects:** China Agriculture Research System (CARS-45-04, CARS-46-03); Natural Science Foundation of Guangdong Province (2015A030313702)