

17 β -雌二醇对大黄鱼性别分化相关基因表达的影响

朱阳阳^{1,2}, 张梦^{1,2}, 叶坤^{1,2}, 沈伟良³, 吴雄飞³, 王志勇^{1,2}

(1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021; 2. 农业部东海海水健康养殖重点实验室, 福建 厦门 361021;
3. 宁波市海洋与渔业研究院, 浙江 宁波 315103)

[摘要] 为了解 17 β -雌二醇(E2)对大黄鱼性别决定与性腺发育相关基因表达的影响,在鱼苗培育到 41 dph(days post-hatch)时分别投喂添加了 0、80、120 mg/kg 17 β -雌二醇的配合饲料,并在开始饲喂前(41 dph)和开始饲喂后第 30 天(70 dph)、第 50 天(90 dph)、第 80 天(120 dph)取样,用大黄鱼性别特异分子标记进行遗传性别鉴定后,挑选出遗传雄性(XY)个体,采用 qRT-PCR 技术检测性腺中 *amh*、*gsdf*、*cyp19a* 和 *foxl2* 四个性别发育与分化相关基因的表达情况。结果表明, E2 能下调 *amh*、*gsdf*、*foxl2* 的表达,对不同发育阶段的大黄鱼体内的性激素转化通路(*cyp19a*)的影响不同。

[关键词] 大黄鱼; 雌二醇; 性别分化; 基因表达

[中图分类号] S 965.322

Effects of 17 β -estradiol on the Expression of Genes Related to Sex Differentiation of the Large Yellow Croaker

ZHU Yangyang^{1,2}, ZHANG Meng^{1,2}, YE Kun^{1,2}, SHEN Weiliang³, WU Xiongfei³, WANG Zhiyong^{1,2}

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea, Ministry of Agriculture, Jimei University, Xiamen 361021, China; 3. Ningbo Institute of Ocean and Fishery, Ningbo 315103, China)

Abstract: The goal of the present study was to investigate the effect of 17 β -estradiol(E2) treatment on the expression of genes related to sex determination and gonadal development in the large yellow croaker. When the fry were grown to 41dph(days post-hatch), they were fed with compound feed containing 0, 80 and 120 mg/kg 17 β -estradiol, and sampled before starting feeding(41 dph) and 30th d(70 dph), 50th d(90 dph), 80th d(120 dph) after starting feeding. After genetic sex identification with sex-specific molecular markers of the large yellow croaker genetic male(XY) individuals were selected, quantitative real-time PCR(qRT-PCR) was used to analyze the expression levels of genes involved in sexual development and differentiation including *amh*, *gsdf*, *cyp19a* and *foxl2* in gonads. The results indicated that E2 could down-regulate the expression of *amh*, *gsdf* and *foxl2*, and has different effects on the sex hormone conversion pathway(*cyp19a*) in the large yellow croakers at different developmental stages.

Keywords: large yellow croaker(*Larimichthys crocea*); estradiol; sex differentiation; gene expression

[收稿日期] 2018-12-09

[基金项目] 海水鱼类产业技术体系(CARS-47-G04)

[作者简介] 朱阳阳(1991—),男,硕士生,从事水产生物遗传育种研究。通信作者:王志勇(1963—),男,教授,博导,从事水生生物遗传育种与生物技术研究。E-mail:zywang@jmu.edu.cn

0 引言

大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 隶属于鲈形目石首鱼科黄鱼属, 是我国养殖量最大的海水鱼类。因大黄鱼雄性个体出肉率较高, 体形相对修长美观、体色较鲜艳, 使其市场价格较雌鱼高, 部分养殖业者希望培育和养殖全雄大黄鱼。本实验室前期研究表明大黄鱼属雌性同配、雄性异配的 XX ♀ - XY ♂ 性别决定类型^[1-3], 因此培育全雄大黄鱼需要首先培育出 YY 型的“超雄鱼”, 而通过诱导 XY 雄鱼发育成功能性雌鱼 (XY), 再与正常雄鱼 (XY) 交配是获得 YY 型雄鱼的有效途径。此外, 本实验室前期研究已阐明了大黄鱼雌性与雄性的性别分化时间, 建立了大黄鱼遗传性别鉴定与雄性化诱导技术^[4-5], 并研究了 *dmrt1*、*gsdf*、*amh*、*foxl2* 和 *cyp19a* 等雄性与雌性性别决定与发育相关基因的时空表达特性^[6-7], 但诱导大黄鱼雌性化的研究迄今尚未见报道。已有报道显示, 17 β -雌二醇 (E2) 能够影响鱼类性腺早期分化方向, 且已被成功地应用于诱导水产动物雌性化^[8]。如黄鳍结鱼 (*Torputitora*) 在孵化后第 30 天 (30dph (days post-hatch)) 开始用 17 β -雌二醇诱导后, 雌鱼比率从 24.2% 上升到 69.5%^[9]; 牙汉鱼 (*Odontesthes bonariensis*) 在孵化后 6 周开始用 17 β -雌二醇诱导, 雌鱼比例从 27% 提高到 42% ~ 46%^[10]; 用 17 β -雌二醇诱导黄颡鱼 (*Pseudobagrus fulvidraco*) 雄性性逆转, 其逆转率与处理时间和药物含量成正比^[11]。但有关 17 β -雌二醇诱导鱼类雌性化的分子调控机理研究还未见报道。

本研究通过添加不同含量的 17 β -雌二醇 (β -estradiol, E2) 的配合饲料喂养大黄鱼幼鱼, 利用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测 E2 诱导遗传雄性个体性腺中性别决定与发育相关基因的表达变化情况, 以期为探讨 E2 诱导遗传雄性大黄鱼发育成雌鱼的机制, 探讨利用性别发育相关基因表达变化在性腺发育早期确定 E2 诱导雌性化的可行性提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验鱼苗的来源

实验在福建省宁德市金玲水产科技有限公司育苗场进行, 取性腺充分发育成熟的雌性和雄性大黄鱼, 按照正常育苗生产方法进行催产、育苗。鱼苗培育到 41 日龄 (41 dph) 时开始投喂含 17 β -雌二醇 (E2) 的配合饲料进行雌性化诱导, 以未添加 E2 的配合饲料喂养组作为对照。

1.2 实验饲料的制备

17 β -雌二醇购自 aladdin 公司 (CAS50-28-2)。将 E2 粉末用 95% (体积比) 的乙醇溶解, 配制成 4 mg/mL 母液备用。称取一定量的大黄鱼配合饲料 (刚开始用的是一江春公司 0 号颗粒饲料, 80 dph 以后使用该公司 1 号颗粒饵料, 每次配制 10 d 左右的使用量) 放置于干净的塑料盆中, 按照 80 mg/kg 与 120 mg/kg (E2 与饲料的质量比) 的用量分别取相应的 E2 溶液, 加入 100 mL 95% 乙醇稀释后, 用小型喷雾器均匀喷洒到配合饲料上。对照组喷洒等量的 95% 乙醇。喷洒完成后, 饲料放置于室内避光处过夜使乙醇挥发, 然后于 -20 °C 保存待用。

1.3 E2 的诱导处理方法

大黄鱼鱼苗按常规方法培育到第 41 天, 随机取 1800 尾, 按每组 600 尾分别投放到 A、B、C 三个大小均为 2.0 m × 1.0 m × 0.8 m 的小水泥池中。其中: A 池为对照组, 投喂只喷洒过 95% 乙醇的饲料; B、C 两池为实验组, 分别投喂含 E2 质量比为 80 mg/kg、120 mg/kg 的药饵。每天投喂 2 次 (8:00、17:00 各 1 次) 至鱼苗不再摄食为止, 并于投喂 2 h 后进行换水 (换水量为原池水的 2/3)。待至 120 dph 后, 三池全部投喂不含 E2 的商品化饲料进行正常饲养。

1.4 样品采集和制备

E2 诱导处理开始前和开始后的第 30、50、80 天, 即在 41 dph、70 dph、90 dph、120 dph 时, 从 A、B、C 三个池中分别随机捞取约 40 尾鱼苗。用消毒的刀片切去鱼的头部与尾部, 剖开腹部去内脏 (保留性腺) 后放入加有 RNA 保护液的冻存管 (每尾 1 管) 中, 4 °C 放置 1 d 后更换 RNA 保护液,

- 80 ℃ 保存, 用于总 RNA 的提取。切下的尾部则用 95% 的乙醇固定并保存于 - 20 ℃, 用于提取 DNA 进行遗传性别鉴定。

1.5 DNA 提取及幼鱼遗传性别鉴定

采用上海捷瑞生物工程有限公司的 DNA 提取试剂盒, 从固定于 95% 乙醇的幼鱼尾鳍中提取基因组 DNA, 利用本实验室开发的大黄鱼性别特异分子标记引物^[5] (见表 1) 对幼鱼进行遗传性别鉴定。

表 1 性别鉴定及荧光定量 PCR 的引物
Tab. 1 Primers for sex identification and qRT - PCR

引物名称 Primer name	序列 5' - 3' Sequence (5' - 3')	用途 Usage
6F 6F - T 6R	ATCTGTCAACCACTGTAT CATCCCCAGACCTCCACT GGATGGCGTTTGGCTGAG	性别鉴定 Sex identification
β - actin - F β - actin - R	TTATGAAGGCTATGCCCTGCC TGAAGGAGTAGCCACGCTCTGT	内参引物 Internal contro
amh - F amh - R	AGCCAACATCAACAACTGCC TTCATCCAAGTCCACCACCT	荧光定量 PCR Quantitative real-time polymerase chain reaction
gsdf - F gsdf - R	CTGATGGTGGAAACAGTACGAGCC AGAGTGCACACTGAACGACAGTC	
cyp19a - F cyp19a - R	CCGGACAGAGTTTTTCCACAA GAACCGAATGGCTGGAAGTAAC	
foxl2 - F foxl2 - R	AAACCACCGTACTCTTATGTCG GGTTGTGTCTGATACTGTTCTGCC	

1.6 总 RNA 提取、cDNA 合成和 qRT - PCR

幼鱼样品经遗传性别鉴定后, 每组每个采样时间点各取 9 尾遗传雄性和遗传雌性个体, 每 3 尾的性腺构成 1 个混合样品。用购自北京全式金生物技术有限公司的 Trans Zol Up Plus RNA Kit 试剂盒进行 RNA 提取, 用 GoScript™ Reverse Transcription System (Promega, 购自上海泰京生物技术有限公司) 试剂盒, 按照其说明书步骤进行 cDNA 第一条链的合成。cDNA 合成后用 β - actin 的引物 (见表 1) 检测反转录效果。

以 β - actin 基因为内参基因, 使用 LightCycler 480 (Roche, USA) 荧光定量 PCR 仪, 按照 SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒 (TaKaRa, 购自宝生物工程 (大连) 有限公司) 使用说明, 采用 qRT - PCR 方法检测各个混合样品中 foxl2、cyp19a、gsdf、amh 基因的表达情况 (各基因的扩增引物见表 1, 所有引物均由华大基因合成)。PCR 反应体系 20 μL, 包含: ddH₂O 5.0 μL, 2 × SuperReal PreMix Plus (SYBR Green I) 10 μL, 上下游引物 (10 μmol/L) 各 0.5 μL, 模板 4.0 μL (逆转录制备的 cDNA 模板按照 1: 20 的比例稀释后使用)。PCR 反应条件及程序: 94 ℃ 预变性 1 min; 94 ℃ 变性 10 s, 60 ℃ 退火 30 s (35 个循环); 荧光采集 80 ℃ 30 s。

1.7 数据处理

对 qRT - PCR 的结果, 采用 2^{-ΔΔC_t} 的方法^[12] 处理。用 SPSS 23.0 软件对所得数据进行单因素方差分析 (one-way ANOVA)。

2 结果

2.1 大黄鱼遗传性别鉴定

本研究中对 A、B、C 三组 4 个时间点采集的幼鱼各取 30 尾进行了遗传性别鉴定, 其电泳检测结果 (见图 1) 表明: 遗传雌性和雄性都有一条 384 bp 的条带, 而遗传雄性个体还有一条 194 bp 的扩增条带。

遗传性别统计结果如表 2 所示。各组遗传雌性与遗传雄性幼鱼比例相近，基本都接近 1:1。

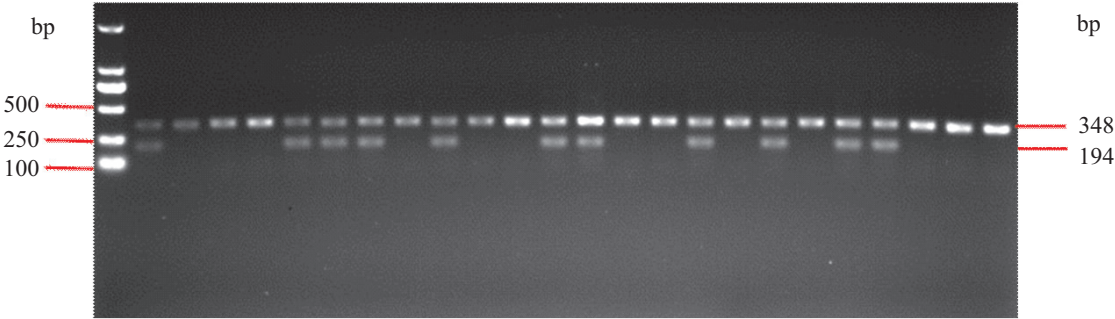


图 1 大黄鱼遗传性别的鉴定

Fig. 1 Identification genetic sex of large yellow croaker

表 2 各组幼鱼遗传性别鉴定的结果

Tab. 2 Results of genetic sex identification of fries in each group

采样时间 Sample time	A(对照组 Control)		B(80 mg/kg)		C(120 mg/kg)		尾 ind
	遗传雌性 XX	遗传雄性 XY	遗传雌性 XX	遗传雄性 XY	遗传雌性 XX	遗传雄性 XY	
41 dph	13	17	12	18	17	13	
70 dph	15	15	11	19	15	15	
90 dph	18	12	16	14	11	19	
120 dph	13	17	15	15	14	16	
合计 Total	59	61	54	66	57	63	

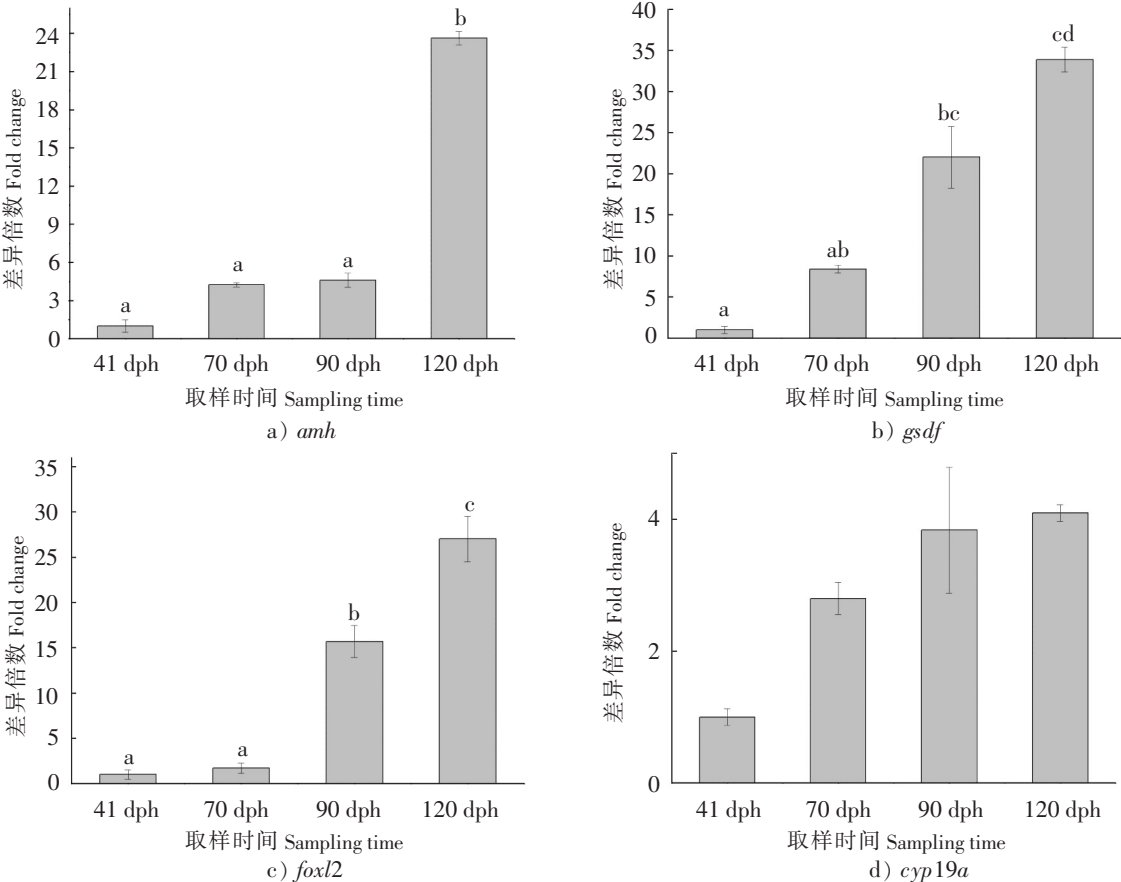
2.2 无 E2 处理的大黄鱼幼鱼 4 个性别相关基因表达情况

qRT-PCR 检测结果（见图 2）显示，41 dph 时 *amh*、*gsdf*、*foxl2* 三个基因在遗传雄性幼鱼性腺中都只有微量表达，随后在整个实验过程中表达量不断上调，且在 120 dph 时达到高峰。其中：*amh* 基因在 90 dph 时表达量仅微量上调，与 41 dph 时无显著差异，但 90 dph 后表达量急剧上升，至 120 dph 时表达量为 41 dph 时的 23.5 倍、90 dph 时的 5 倍（见图 2a）；*gsdf* 的表达量则在 70 dph 时就上调到 41 dph 时的 9 倍，至 90 dph 时上调至 41 dph 时的 22 倍，至 120 dph 时表达量则达到 41 dph 时的 33.8 倍且出现显著差异（见图 2b）；*foxl2* 在 70 dph 时表达量仍然维持在与 41 dph 时接近的水平，其后表达量急剧上升，至 90 dph 时达到 41 dph 时的 15.7 倍，120 dph 时表达量已达到 41 dph 时的 27 倍（见图 2c）。*cyp19a* 基因在整个实验阶段其表达量也呈缓慢上升趋势，但上升的幅度不大，到 120 dph 时表达量为 41 dph 时的 4 倍左右，且各时间点表达量差异不显著（ $P > 0.05$ ，图 2d）。

2.3 E2 处理对大黄鱼性腺中 4 个性别相关基因表达的影响

以对照组遗传雄性幼鱼同时期同基因的表达量为参照，统计分析经不同含量的 E2 处理后遗传雄性大黄鱼幼鱼性腺中 *amh*、*gsdf*、*foxl2* 和 *cyp19a* 基因的表达情况。结果（见图 3）显示，经过 E2 处理后，遗传雄性大黄鱼幼鱼性腺中 *amh*、*gsdf* 和 *foxl2* 基因的表达均受到抑制，表达量显著下调。*amh* 基因在 E2 处理第 30 天（70 dph）表达量开始出现显著下降，80 mg/kg 与 120 mg/kg 两个处理组分别只有对照组遗传雄性幼鱼表达量的 1/13 和 1/14，但仍高于对照组遗传雌性幼鱼卵巢中的表达量（ $P > 0.05$ ）；90 dph 时 80 mg/kg 组基因表达量与 70 dph 时差别不大，为对照组遗传雄性幼鱼的 1/12，而 120 mg/kg 组下降幅度稍大，为对照组遗传雄性幼鱼的 1/16，但两个处理组间差异不显著（ $P > 0.05$ ），且均高于对照组遗传雌性幼鱼卵巢中的表达量（ $P > 0.05$ ）；120 dph 时 80 mg/kg 组下降的幅度略有增大，*amh* 表达量为对照组遗传雄性幼鱼的 1/15，高于对照组遗传雌性幼鱼卵巢中的表达量，但差异不显著（ $P > 0.05$ ），而 120 mg/kg 组表达量仅为对照组的 1/82，与遗传雌性幼鱼卵巢中的表

达量基本一致 (见图 3a)。*gsdf* 与 *amh* 一样也在 E2 处理第 30 天 (70 dph) 表达量就出现显著下降, 两个 E2 组下降的幅度相近, 都为对照组遗传雄性幼鱼的 1/3, 约为对照组遗传雌性幼鱼的 28 倍 ($P < 0.01$); 其后 *gsdf* 的表达量进一步下降, 90 dph 时两个处理组的表达量均只有对照组雄性幼鱼的 1/11 左右、对照组雌性幼鱼的 8 倍 ($P > 0.05$); 120 dph 时 80 mg/kg 组 *gsdf* 的表达量略有回升, 为对照组遗传雄性的 1/4、对照组遗传雌性的 18 倍 ($P < 0.05$), 而 120 mg/kg 组 *gsdf* 的表达量则进一步下降到对照组遗传雄性幼鱼的 1/15、对照组遗传雌性的 5 倍 ($P > 0.05$, 见图 3b)。*foxl2* 基因在 70 dph 时两个 E2 实验组中的表达量均有所下降, 但与对照组雄性幼鱼差异尚不显著, 仅与对照组雌性幼鱼存在显著差异 ($P < 0.05$); 到 90 dph 时 *foxl2* 的表达水平与对照组相比均显著下降 ($P < 0.05$), 80 mg/kg 与 120 mg/kg 两个处理组分别只有对照组遗传雄性幼鱼的 1/16、1/41, 以及对照组遗传雌性幼鱼的 1/110、1/290; 到 120 dph 时表达水平更低, 80 mg/kg 组的表达量只有对照组遗传雄性幼鱼的 1/24、对照组遗传雌性幼鱼的 1/177, 120 mg/kg 组 *foxl2* 基因的表达量只有对照组遗传雄性幼鱼的 1/277、对照组遗传雌性幼鱼的 1/2006 (见图 3c)。遗传雄性大黄鱼经 80 mg/kg E2 处理后, 性腺中 *cyp19a* 基因的表达量在处理第 30 天 (70 dph) 和第 50 天 (90 dph) 也出现了较明显的下降 ($P > 0.05$), 120 dph 时恢复到与对照组遗传雄性幼鱼同样的水平, 但仍然显著低于对照组中同样日龄的遗传雌性; 而在 120 mg/kg E2 处理后的第 30 天 (70 dph) 和第 50 天 (90 dph), *cyp19a* 的表达量则上调到与对照组遗传雌性基本一致的水平, 但在 120 dph 时又下降到只有对照组遗传雄性的 60% 左右 ($P > 0.05$)、对照组遗传雌鱼的 1/3 左右 ($P < 0.05$, 见图 3d)。



说明:不同字母之间表示差异显著。
Note:Significant difference between different letters.

图2 不同时间点对照组遗传雄性大黄鱼性腺中 *amh*、*gsdf*、*foxl2*、*cyp19a* 基因的表达
Fig.2 Expression of *amh*、*gsdf*、*foxl2* and *cyp19a* genes in gonads of genetic male large yellow croakers in different periods

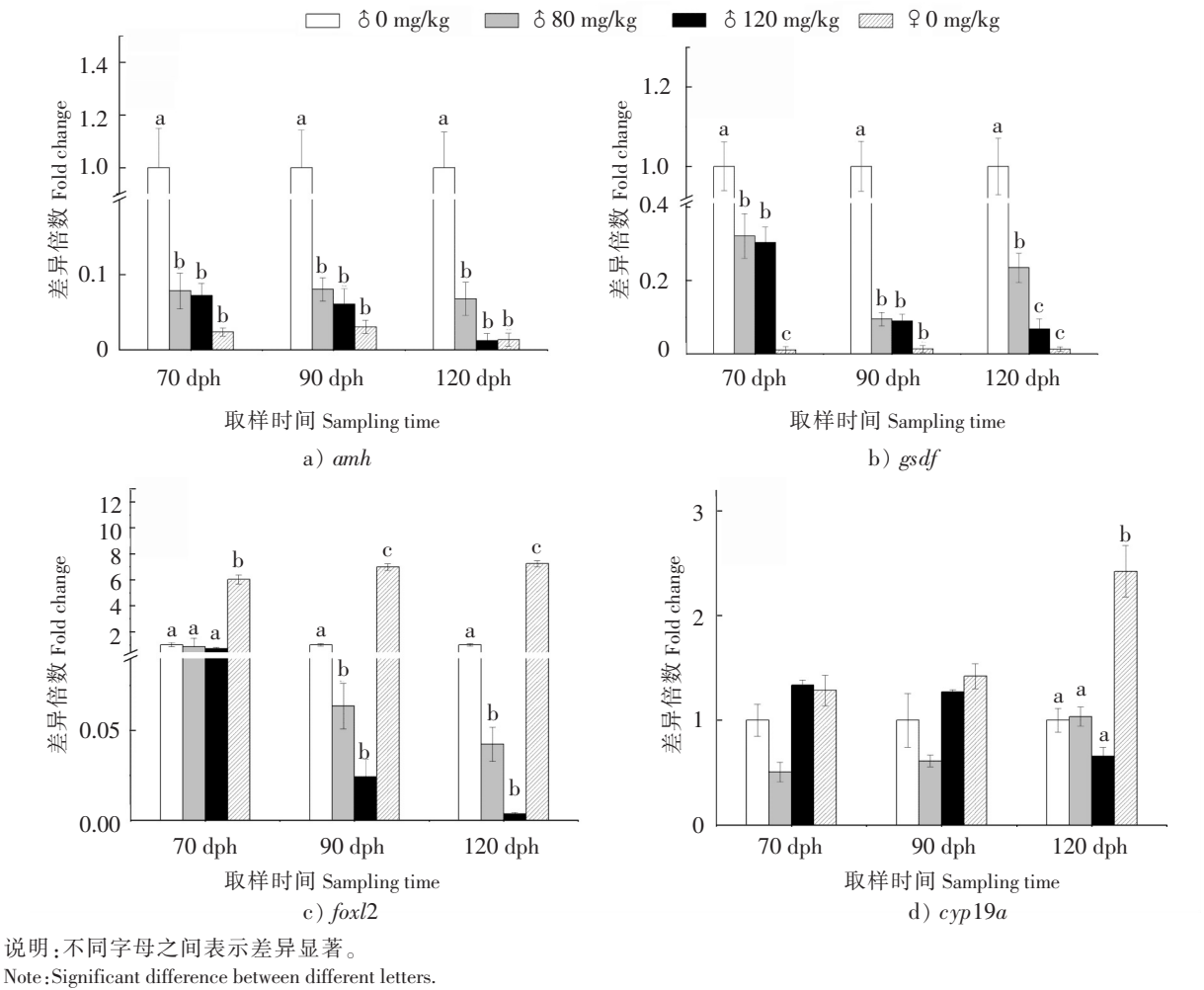


图 3 E2 处理后大黄鱼 *amh*、*gsdf*、*foxl2*、*cyp19a* 基因的表达变化

Fig.2 Expression changes of *amh*, *gsdf*, *foxl2* and *cyp19a* genes in large yellow croaker after E2 treatment

3 讨论

本研究对 360 尾实验鱼进行了遗传性别鉴定,发现遗传雌性有 170 尾、遗传雄性有 190 尾,统计检验认为雌雄性比符合 1:1 的比例,表明大黄鱼性别主要由遗传决定。已有研究证实,雌激素类物质长期作用可影响鱼类的性腺发育,导致性腺形态和组织学结构出现雌性化特征甚至发生性逆转现象^[13-16],但对其作用机制并不十分明了。从形态学上能够区分雌雄之前,就可以记录鱼类性别分化相关基因的表达图谱^[17]。在大黄鱼中,游秀容等^[18]通过组织学观察发现大黄鱼精巢和卵巢的细胞学分化发生在 120 日龄之后,且卵巢的细胞学分化早于精巢。曹款等^[19]通过对 3 月龄大黄鱼性腺的转录组学分析,挖掘了众多雌雄差异表达的基因。林爱强等^[6]发现 *dmrt1*、*gsdf*、*amh* 等基因在大黄鱼发育的不同时期表达量不同,且存在雌雄差异表达的现象。因此推测,大黄鱼体内存在一个复杂的调控网络来控制其性别的发育方向。

本实验采用 qRT-PCR 的方法,试图从转录水平上研究 E2 促进大黄鱼发育为雌性的机制。本研究中对照组大黄鱼遗传雄性幼鱼的 *amh*、*gsdf*、*foxl2* 三个性腺分化相关基因的表达情况与林爱强等^[6]的前期研究结果基本相符;遗传雄性幼鱼 *cyp19a* 基因虽然在整个实验过程中也呈上升趋势,但各取样时期差异并不显著,与淇河鲫 (*Carassius auratus* in Qihe River)^[13]发育早期的研究相似。

amh 基因在硬骨鱼性腺发育中起着重要的作用,主要调节精原细胞的增殖和分化^[20],并且已有

研究证明 *amhY* 基因是银汉鱼 (*Menidia menidia*) 的性别决定基因^[21], *gsdf* 基因对 PGC 和精原细胞的增殖同样起到重要作用^[22]。本研究结果显示, E2 能够显著下调大黄鱼遗传雄性幼鱼性腺中 *amh* 基因的表达, 并呈现对作用时间和剂量的依赖性。这与红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*)^[17] *amh* 基因在炔雌醇作用下的表达情况十分相似。红鳍东方鲀在 55 ~ 116 dph 持续处理期间, 其表达量与对照组遗传雄性相比显著下调, 而与遗传雌性没有显著差异。同样地, 本研究中 E2 处理也显著下调了遗传雄性大黄鱼性腺中 *gsdf* 基因的表达, 也呈现出对作用时间和剂量的依赖性。已知 *amh* 和 *gsdf* 基因是与雄性别及精巢发育相关的重要基因, 在大黄鱼雄性性腺中高表达^[6], 并且根据作者前期利用 E2 诱导大黄鱼雌性化的实验结果, 120 mg/kg 剂量组的诱导效果显著优于 80 mg/kg 组 (已申请专利)。因此 *amh* 和 *gsdf* 基因的低表达对于诱导遗传雄性大黄鱼幼鱼发育成雌鱼是必需的, 而且足够的 E2 含量和处理时间是必要的。

在鱼类中, *foxl2* 基因主要在卵巢中表达^[23]。在罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*) 中利用靶向基因敲除技术敲除雌性个体中的 *foxl2* 基因, 导致其性逆转为雄性^[24]。本研究在大黄鱼中也发现 *foxl2* 为雌性高表达基因。但本研究结果却显示, 经 E2 处理后遗传雄性大黄鱼性腺中 *foxl2* 的表达却出现下调的现象, 而且随着处理浓度增加和处理时间延长, 下调的幅度更加显著。这一结果与雌激素作用下的斑马鱼 (*Danio rerio*)^[25]、红鳍东方鲀^[17] 的研究结果相悖, 推测原因可能是由于药饵中雌二醇含量过高, 鱼苗吸收了大量的外源雌激素 E2, 导致体内的雌激素浓度过高, 以负反馈机制抑制了内源雌激素的生成, 而 *foxl2* 作为 *cyp19a* 的上游调控基因^[17], 其表达量可能也受到了影响。在整个实验过程中, 经 E2 处理后雄性幼鱼性腺中芳香化酶基因 *cyp19a* 的表达水平则表现出无规律的变化, 这与已报道的 17 β -雌二醇作用于斑马鱼^[25] 以及 17 α -炔雌醇作用于红鳍东方鲀^[17] 所得到的结果基本一致, 可能是外源性雌激素的持续作用使体内芳香化酶基因的表达机制紊乱, 其原因究竟为何, 值得深入研究加以阐明。

综上所述, 本实验从转录水平探究了 17 β -雌二醇对大黄鱼早期性别分化相关基因表达的影响。发现 E2 能够下调部分雄性相关基因 (*amh*、*gsdf*) 的表达, 并呈现出一定的作用时间和作用剂量的依赖性, 研究结果提示将雄性发育相关基因的表达水平降低到与正常雌鱼相近的水平可能是伪雌鱼诱导成功的关键。同时, 下调部分雌性相关基因 (*foxl2*) 的表达, 对大黄鱼体内 *cyp19a* 基因的表达在不同发育阶段的影响不同。本文为阐明大黄鱼的性别发育与分化的分子机制, 以及全雄鱼的培育等方面提供了基础资料。

[参 考 文 献]

- [1] 王志勇, 蔡明夷, 谢仰杰. 大黄鱼雌核发育和性别控制技术 [M] //陈松林. 鱼类性别控制与细胞工程育种. 北京: 科学出版社, 2013: 274-296.
- [2] 叶小军, 王志勇, 刘贤德, 等. 大黄鱼连续两代雌核发育群体的微卫星标记分析 [J]. 水生生物学报, 2010, 34(1): 144-151.
- [3] WANG Z Y, CAI M Y. Artificial gynogenesis and sex control in large yellow croaker [M] //WANG H P, PIFERRER F, CHEN S L. Sex Control in Aquaculture. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2018: 751-773.
- [4] LIN A, XIAO S, XU S, et al. Identification of a male-specific DNA marker in the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) [J]. Aquaculture, 2017, 480: 116-122.
- [5] 林晓煜, 肖世俊, 李完波, 等. 大黄鱼性别特异 SNP 标记的开发与验证 [J]. 水产学报, 2018, 42(9): 3-11.
- [6] 林爱强, 谢仰杰, 徐双斌, 等. 大黄鱼 *gsdf* 和 *amh* 基因的克隆及表达分析 [J]. 南方水产科学, 2017(6): 1-13.
- [7] 陈芸, 周鹏, 张子平, 等. 大黄鱼 *cyp19a/b* 基因的克隆与表达分析 [J]. 集美大学学报 (自然科学版), 2015, 19(2): 81-89.
- [8] PIFERRER F. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish [J]. Aquaculture, 2001, 197: 229-281.

- [9] SINGH A K. Introduction of modern endocrine techniques for the production of monosex population of fishes. [J]. General and Comparative Endocrinology, 2013, 181: 146-155.
- [10] PEREZ M R, FERNANDINO J I, CARRQUIRIBORDE P, et al. Feminization and altered gonadal gene expression profile by ethinylestradiol exposure to pejerrey, *Odontesthes bonariensis*, a South American teleost fish [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2012, 31(5): 941-946.
- [11] PARK I, KIM J, CHO S H, et al. Sex differentiation and hormonal sex reversal in the bagrid catfish *Pseudobagrus fulvidraco* (Richardson) [J]. Aquaculture, 2004, 232: 183-193.
- [12] 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.
- [13] 李永婧, 吴利敏, 王磊, 等. 淇河鲫 *cyp19a1b* 基因的克隆表达及芳香化酶抑制剂对其表达的影响 [J]. 水产学报, 2018, 42(8): 1169-1180.
- [14] HU P, LIU B, MENG Z, et al. Recovery of gonadal development in tiger puffer *Takifugu rubripes* after exposure to 17β -estradiol during early life stages [J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2017, 35(3): 613-623.
- [15] BHANDARI R K, NAKAMURA M, KOBAYASHI T, et al. Suppression of steroidogenic enzyme expression during androgen-induced sex reversal in *Nile tilapia* (*Oreochromis niloticus*) [J]. General and Comparative Endocrinology, 2006, 145(1): 20-24.
- [16] BRION F, TYLER C R, PALAZZI X, et al. Impacts of 17β -estradiol, including environmentally relevant concentrations, on reproduction after exposure during embryo-larval-, juvenile- and adult-life stages in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Aquatic Toxicology, 2004, 68(3): 193-217.
- [17] VIZZIANO-CANTONNET D, BARON D, MAHE S, et al. Estrogen treatment up-regulates female genes but does not suppress all early testicular markers during rainbow trout male-to-female gonadal transdifferentiation [J]. Journal of Molecular Endocrinology, 2008, 41(5): 277-288.
- [18] 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.
- [19] 曹款, 肖世俊, 王志勇, 等. 利用 RNA-Seq 技术从大黄鱼性腺中发现性别差异基因 [C] //中国水产学会学术年会论文摘要集, 杭州: 中国水产学会, 2015: 22.
- [20] NISHI M Y, DOMENICE S, MACIELGUERRA A T, et al. Analysis of anti-Müllerian hormone (AMH) and its receptor (AMHR2) genes in patients with persistent Müllerian duct syndrome [J]. Arquivos Brasileiros De Endocrinologia E Metabologia, 2012, 56(8): 473-478.
- [21] HATTORI R S, MURAI Y, OURA M, et al. A Y-linked anti-Müllerian hormone duplication takes over a critical role in sex determination [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(8): 2955-2959. DOI:10.1073/pnas.1018392109.
- [22] SAWATARI E, SHIKINA S, TAKEUCHI T, et al. A novel transforming growth factor- β superfamily member expressed in gonadal somatic cells enhances primordial germ cell and spermatogonial proliferation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Developmental Biology, 2007, 301(1): 266-275.
- [23] NAKAMOTO M, MATSUDA M, WANG D, et al. Molecular cloning and analysis of gonadal expression of *Foxl2* in the medaka, *Oryzias latipes* [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006, 344(1): 353-361.
- [24] LI M H, YANG H H, LI M R, et al. Antagonistic roles of *Dmrt1* and *Foxl2* in sex differentiation via estrogen production in tilapia as demonstrated by TALENs [J]. Endocrinology, 2013, 154(12): 4814-4825.
- [25] 李国超. 17β -雌二醇对斑马鱼的毒性研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2015.

(责任编辑 朱雪莲 英文审校 黄力行)