

doi: 10.7541/2021.2020.142

未产卵雌性黄鳢的性转变

范森¹ 杨威¹ 孙数¹ 李忠^{2,3} 张利红^{1*} 张为民^{1*}

(1. 中山大学生命科学学院水生经济动物研究所, 广州 510275; 2. 仙桃市忠善黄鳢工厂化繁育基地, 仙桃 433012;
3. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 武汉 430223)

摘要: 为探讨产卵是否为雌性黄鳢(*Monopterus albus* Zuiew)性转变的必经过程, 研究分析了实验室内从受精卵或幼苗开始养殖至不同时间段的黄鳢性腺组织学状况, 采用性腺活检技术跟踪了34月龄雌性黄鳢性腺发育变化, 并以免疫组织化学方法探讨了黄鳢不同发育状态性腺中增殖细胞核抗原(PCNA)的分布。在养殖过程中, 实验黄鳢没有出现产卵现象或者繁殖行为。在5月龄黄鳢中, 间性占比13.3%, 雄性占比20.0%; 在12月龄(1龄)黄鳢中, 雄性占比17.6%; 34月龄(3龄)黄鳢中, 间性占比12.8%, 雄性占比8.5%。通过性腺活检技术对36条34月龄雌性黄鳢性腺发育变化进行了为期1个月的跟踪研究, 结果表明, 16.7%的雌性黄鳢发生了性转变, 性腺发育到间性阶段。黄鳢间性早期性腺生殖褶增厚, 部分细胞呈现明显PCNA免疫阳性, 包括间质细胞、精原细胞和初级精母细胞。上述结果提示, 产卵并非雌性黄鳢发生性转变的必经过程; 黄鳢性转变初期, 性腺结构变化包括生殖褶中间质细胞和精原细胞的发生和增殖。

关键词: 黄鳢; 性转变; 性腺组织学; 活检技术; 增殖细胞核抗原

中图分类号: Q174

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2021)02-0387-10



脊椎动物性别决定和分化发育机制一直是生物学研究热点。目前研究表明, 脊椎动物性别决定方式包括基因决定性别和环境因素决定性别, 性别分化方向呈现可塑性^[1]。鱼类具有雌雄异体和雌雄同体等多种性别表现形式, 性别分化可塑性高, 是研究脊椎动物性别决定和分化发育的良好模型。同时, 很多鱼类在生长和体型等方面呈现性别二态型, 通过性控育种实现单性化养殖将产生重大的经济效益^[2, 3], 而鱼类性别决定和分化机制研究是实现鱼类性控育种的基础。

黄鳢(*Monopterus albus* Zuiew)隶属合鳃鱼目, 合鳃鱼科, 黄鳢属, 是目前我国重要的特色淡水养殖鱼类, 在湖北、安徽和湖南等地广泛养殖。但是, 黄鳢养殖的苗种仍主要是人工捕获的野生黄鳢。由于过度捕捞, 近年来黄鳢自然资源日益减少, 严重影响黄鳢规模化人工养殖业可持续发展。早在1944年, 我国脊椎动物性别决定研究先驱刘建康先生发现黄鳢是一种雌性先熟的性转变鱼类^[3]。由

于幼体阶段性腺分化发育的单向性(雌性)和成体阶段性腺自然可塑性(雌性转变为雄性), 黄鳢已成为研究脊椎动物性别分化发育机制的重要鱼类模型^[4]。黄鳢自然性转变规律和调控机制的阐明不仅具有很高的理论价值, 也将为其规模化人工繁育技术研发提供重要的支撑。

Liu^[5]通过分析在重庆北碚野外采集的黄鳢性腺组织学结构及其性别比例, 首次提出黄鳢具有自然性转变现象。随后, Liem^[6]分析了印度尼西亚万隆地区野外捕获和实验室养殖的黄鳢性腺组织学结构和性别比例, Chan和Phillips^[7]分析了中国香港和广东地区的黄鳢性腺组织学结构和性别比例, 这些研究都证实了黄鳢存在自然性转变。Chan等^[8]通过活体解剖技术跟踪同一条黄鳢性腺组织学变化, 进一步直接证实了黄鳢存在自然性转变。雄性黄鳢都是从雌性黄鳢通过间性阶段转变而来, 没有发现雄鱼再转变为间性或雌性的现象^[6, 8]。

在黄鳢卵巢向精巢转变时, 最早出现的组织结

收稿日期: 2020-06-15; 修订日期: 2020-11-10

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD0900203); 国家自然科学基金(31672638和 31572604)资助 [Supported by the National Key Research and Development Program (2018YFD0900203); the National Natural Science Foundation of China (31672638 and 31572604)]

作者简介: 范森(1994—), 男, 学士; 主要研究方向为鱼类生理学。E-mail: fanm5@mail2.sysu.edu.cn

通信作者: 张利红, 博士, 教授; E-mail: zhlih@mail.sysu.edu.cn; 张为民, 博士, 教授; E-mail: lsszwm@mail.sysu.edu.cn *共同通信作者

构变化是生殖褶增厚,并在生殖褶内围出现零星的雄性生殖细胞;随着雄性生殖细胞的增殖和雌性生殖细胞的退化,最终卵巢被精巢所取代,雌性黄鳢转变为雄性黄鳢^[9]。关于雌性黄鳢在什么发育阶段开始性转变,有些学者认为是在雌鳢性成熟产卵后发生^[5, 7, 10-12]。通过分析年龄、体长和体重等与黄鳢性转变的相关性,发现黄鳢性别与年龄和体长关系较密切^[13]。有研究表明,雌性黄鳢2龄后开始性转变^[6, 13]。由于生存环境和/或地理位置的不同,不同地区的黄鳢发生性转变时体长不同,印度尼西亚万隆地区黄鳢在体长为16 cm左右时开始性转变^[6],中国香港和广东地区的黄鳢在体长为20 cm左右时开始性转变^[7],中国天津地区的黄鳢在体长为40 cm左右时发生性转变^[14]。

增殖细胞核抗原(Proliferating cell nuclear antigen, 简称PCNA)是真核细胞DNA合成所必需的一种核蛋白。在细胞增殖过程中,PCNA表达量在G1晚期开始上升,S期达到高峰,G2期下降^[15, 16]。PCNA作为细胞增殖的分子标记,常用于分析鱼类性腺细胞的增殖。美洲花鳢(*Synbranchus marmoratus* Bloch)是一种先雌后雄的性转变鱼类,其性转变早期性腺结缔组织中Leydig细胞的PCNA免疫活性很高^[17]。在孵化180d的黑棘鲷(*Acanthopagrus schlegelii* Bleeker)早期精巢中,发现生殖细胞中有PCNA免疫阳性信号^[18]。本文分析了实验室内从受精卵或幼苗开始养殖至不同时段黄鳢性腺发育状况,并对性腺进行了PCNA免疫组织化学分析,旨在阐明黄鳢性转变的基本规律,以及间性性腺中各种细胞增殖与性转变的关联。

1 材料与方法

1.1 实验黄鳢及其饲养

5月龄黄鳢为仙桃市忠善黄鳢工厂化繁育基地(湖北仙桃)2019年7月孵出的黄鳢苗,于2019年9月运回本实验室(广东广州)饲养;12月龄和34月龄黄鳢分别为本实验室于2018年5—6月和2016年5—6月孵化的黄鳢苗养成。在自然光照和温度条件下,参照何智等^[19]报道的方法,实验室内黄鳢饲养于直径为80 cm的塑料盆中,投喂生物饵料(先期为水蚯蚓,5月龄后为黄粉虫),投喂量约为体重的5%。养殖盆中放置1—2条灰色塑料管(直径6.5 cm,长度37 cm),以便黄鳢藏匿,模仿其生态习性。每天换水,并根据生长情况适时分盆,控制养殖密度^[20]。5月龄和12月龄黄鳢一直饲养在实验室内,34月龄黄鳢在性腺活检手术前1个月转移至室外水泥池(1 m×1 m×1 m)中饲养。在整个饲养和实验过程中,

每天上、下午观察和记录黄鳢生存状态。

1.2 黄鳢性腺样品的采集和分析

通过性腺活检手术^[8]获得黄鳢性腺样品。黄鳢肠道位于腹腔的腹面,肾脏位于腹腔的背面,紧贴背壁,性腺位于肠道与肾脏之间,呈管状,以肠系膜与肠道相连。黄鳢性腺活检手术基本操作如下:使用麻醉剂MS-222(500 mg/L; Sigma, A5040, MO, USA)麻醉实验黄鳢。将麻醉后的黄鳢置于实验台,腹面朝上,用碳钢手术刀片(11号;上海浦东金环医疗用品股份有限公司,中国上海)于麻醉黄鳢泄殖孔前0.3—0.5 cm处腹中线偏右上方纵向开口0.5—1 cm,小心把性腺与肠系膜剥离,剪取适量性腺样品后,于腹腔内埋植经75%酒精消毒的电子标签(广州市洪腾条码技术有限公司,中国广州),然后用Δ1/2医用缝合针(6×14;巢湖市宾雄医疗器械有限公司,中国安徽)和非吸收型外科缝合线(4-0;扬州源康医疗器械有限公司,中国江苏)缝合伤口,一般缝合3—5针即可。在缝合处涂抹红霉素药膏(广东恒建制药有限公司,中国广东)后,将术后黄鳢置于曝气水中苏醒。如要对同一条黄鳢个体进行多次活检手术,下一次手术是在上一次手术位置前(头部方向)1—2 mm处实施。

30条5月龄黄鳢[体重(15.3±2.9) g,体长(25.7±1.2) cm]于2019年12月间进行性腺活检手术;17条12月龄黄鳢[体重(9.1±3.1) g,体长(20.3±2.5) cm]和94条34月龄黄鳢[体重(25.5±9.1) g,体长(30.5±3.7) cm]于2019年3—5月间进行性腺活检手术。于2019年3—4月间,对94条34月龄黄鳢中的36条雌鱼[体重(20.8±6.7) g,体长(29.2±3.4) cm]性腺发育进行了为期1个月的跟踪研究。

通过性腺活检手术剪取长约0.5 cm黄鳢性腺组织,置于波恩氏液中固定24h,然后按常规石蜡组织学切片流程处理。切片厚度为4—5 μm,苏木精-伊红(HE)染色,中性树胶封片,使用Nikon显微镜(E800, Nikon, Japan)进行观察和拍照。

1.3 PCNA免疫组织化学定位

黄鳢性腺组织石蜡切片经脱蜡和水化后,用3%过氧化氢(无水甲醇:30%过氧化氢:ddH₂O=8:1:1,现配现用)在室温下处理15min,灭活内源性过氧化物酶;用PBS(137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na₂HPO₄, 2 mmol/L KH₂PO₄; pH=7.4)浸洗3次(每次5min)后,组织切片放入预热(95℃)的0.01 mol/L柠檬酸盐缓冲液(pH=6.0)处理15min,进行抗原修复;取出玻片放凉至室温后,PBS浸洗3次(每次5min),滴加适量的正常山羊血清,在室温湿润的条件下孵育30min,封闭非特异性结合位点;在封

闭后的切片上滴加PCNA即用型抗体(MAB-0145鼠单抗, 克隆号PC10, 福州迈新生物科技有限公司, 中国), 4℃过夜孵育, 再于室温下孵育3h。在一抗孵育完后, 用PBS浸洗切片3次(每次5min), 滴加适量免疫组化信号放大剂(EliVision™ Super, KIT-9922, 福州迈新生物科技有限公司), 室温孵育15min, 经PBS浸洗3次(每次5min), 再滴加适量高敏型酶标抗鼠/兔聚合物(EliVision™ Super, KIT-9922, 福州迈新生物科技有限公司), 室温孵育15min后, PBS浸洗3次(每次5min), DAB(DAB-1031, 福州迈新生物科技有限公司, 中国)显色。阴性对照以PBS代替PCNA抗体, 其余操作一致。用Nikon显微镜(E800, Nikon, Japan)观察切片和拍照。

1.4 数据处理

实验黄鳝体重和体长等生物学参数采用SPSS统计软件进行分析。数据表示为平均值±标准差(Mean±SD)。

2 结果

2.1 未经产卵过程的间性和雄性黄鳝

实验所用黄鳝是从幼鱼(指5月龄鱼)或受精卵(指12月龄和34月龄鱼)开始饲养, 每天记录生活状

况。在饲养过程中, 未发现有任何雌鳝发育至腹部膨大呈半透明状态, 也未观察到养殖盆中有黄鳝卵粒或吐泡筑巢行为, 因此判断实验黄鳝没有经历产卵过程。

用石蜡组织切片和HE染色技术, 分析30条5月龄、17条12月龄和94条34月龄黄鳝的性腺发育状况。结果表明, 在5月龄黄鳝中, 雌性占比66.7%, 间性占比13.3%, 雄性占比20.0%(图1和表1); 在12月龄黄鳝中, 雌性占比82.4%, 雄鱼占比17.6%(图2和表1); 在34月龄黄鳝中, 雌性占比78.7%, 间性占比12.8%, 雄性占比8.5%(图3和表1)。

不同年龄段黄鳝的性别与其个体大小关系分析表明, 在5月龄和34月龄的黄鳝中, 间性和雄性个体较雌性偏大(图4A和4C), 但12月龄黄鳝中雄性个体较雌性偏小(图4B)。

2.2 三龄雌鳝不经产卵过程发生性转变现象

对94条34月龄黄鳝中的36条雌性黄鳝性腺发育进行了跟踪研究。结果表明, 在1个月的跟踪实验过程中, 30条雌鳝依旧为雌性(图5A2和A2'), 但有6条雌鳝变成为间性(图5B2和B2'), 性转变发生比例为16.7%。在黄鳝间性性腺中, 生殖褶增厚, 出现间质细胞, 及早期雄性生殖细胞包括精原细胞和

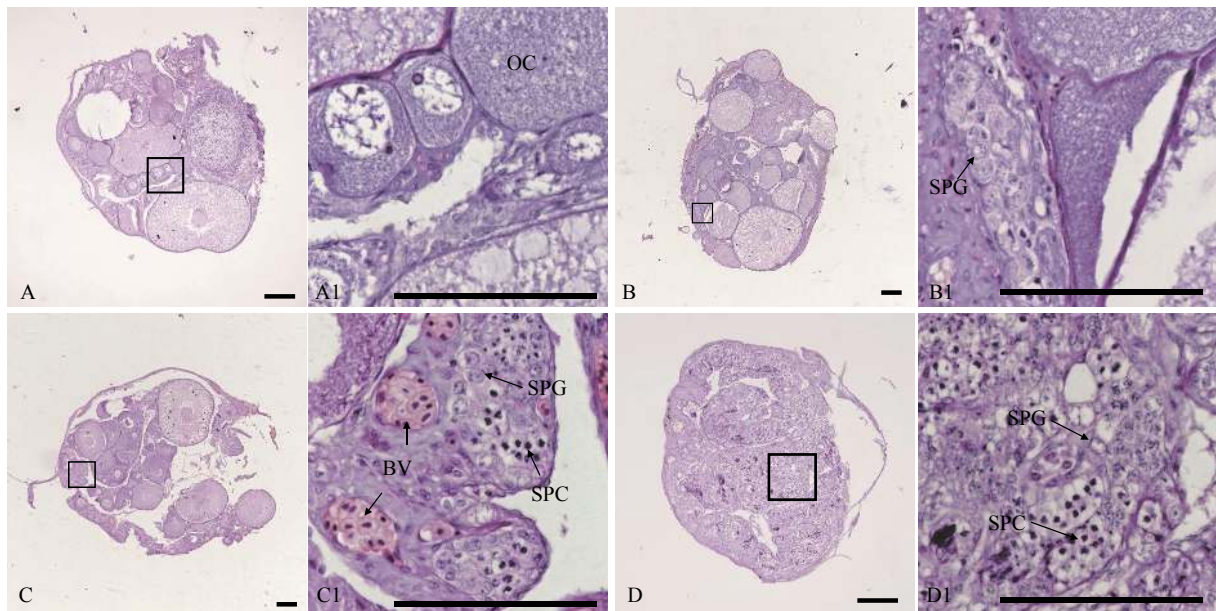


图1 5月龄黄鳝的不同性别状态性腺组织结构

Fig. 1 Gonadal histology of 5-month-old ricefield eels of different sexual stages

A. 雌性(体长25 cm, 体重13.4 g); B. 间性早期(体长25.5 cm, 体重15.7 g); C. 间性中期(体长26.5 cm, 体重16.5 g); D. 雄性(体长27.5 cm, 体重17.1 g); A1、B1、C1和D1分别为A、B、C和D图方框区域放大; OC. 卵母细胞; BV. 血管; SPC. 精母细胞; SPG. 精原细胞; 图中标尺为100 μm

A. female (body length: 25 cm, body weight: 13.4 g); B. early intersexual stage (body length: 25.5 cm, body weight: 15.7 g); C. mid-intersexual stage (body length: 26.5 cm, body weight: 16.5 g); D. male (body length: 27.5 cm, body weight: 17.1 g). A1, B1, C1, and D1 are the higher magnification of the boxed areas in A, B, C, and D, respectively. OC. oocyte; BV. blood vessel; SPC. spermatocyte; SPG. spermatogonia. Scale bar=100 μm

表 1 不同年龄段黄鳝的性别比例

Tab. 1 Sex ratios of ricefield eels at different ages

年龄Age	样本数 (尾)Number of samples	雌性Female		间性Intersex		雄性Male	
		数量 (尾) No.	占比 (%) Ratio	数量 (尾) No.	占比 (%) Ratio	数量 (尾) No.	占比 (%) Ratio
5月5-month-old	30	20	66.7	4	13.3	6	20.0
12月12-month-old	17	14	82.4	0	0	3	17.6
34月34-month-old	94	74	78.7	12	12.8	8	8.5

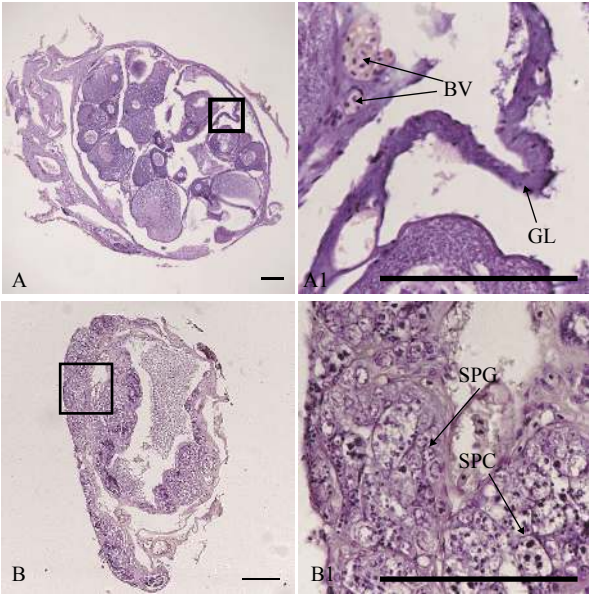


图 2 12月龄黄鳝的不同性别状态性腺组织结构

Fig. 2 Gonadal histology of 12-month-old ricefield eels of different sexual stages

A. 雌性(体长27 cm, 体重13.5 g); B. 雄性(体长23 cm, 体重9 g); A1和B1分别为A和B图方框区域的放大; GL. 生殖褶; BV. 血管; SPC. 精母细胞; SPG. 精原细胞; 图中标尺为100 μm

A. female (body length: 27 cm, body weight: 13.5 g); B. male (body length: 23 cm, body weight: 9 g). A1 and B1 are higher magnification of the boxed areas in A and B, respectively. GL. gonadal lamellae; BV. blood vessel; SPC. spermatocyte; SPG. spermatogonia. Scale bar=100 μm

精母细胞(图 5B2’).

2.3 黄鳝性转变过程中性腺PCNA免疫组织化学分析

对同一黄鳝个体的不同发育阶段的性腺进行PCNA免疫组织化学分析, 结果表明, 在卵黄发生期黄鳝卵巢中, 卵母细胞的细胞核及其外周部分滤泡层细胞核具有明显的PCNA免疫阳性信号(图 6A1); 卵巢中生殖褶很薄, 仅见个别细胞的细胞核具有PCNA免疫阳性信号(图 6A2)。

在间性早期黄鳝性腺中, 除卵母细胞的细胞核及其外周部分滤泡层细胞核可观察到明显的PCNA免疫活性信号(图 6B1)外, 增厚的生殖褶中也出现明显的PCNA免疫信号。这些PCNA免疫信号主要分布在生殖褶两类细胞, 其中一类为间质细胞, 另一类为雄性生殖细胞, 包括精原细胞和初级精母细胞(图 6B2)。

在间性晚期黄鳝性腺中, 退化卵母细胞上未见PCNA免疫信号(图 6C1), 增厚的生殖褶中可见不同发育阶段的雄性生殖细胞, 其中精原细胞和初级精母细胞有明显的PCNA免疫信号(图 6C2), 部分间质

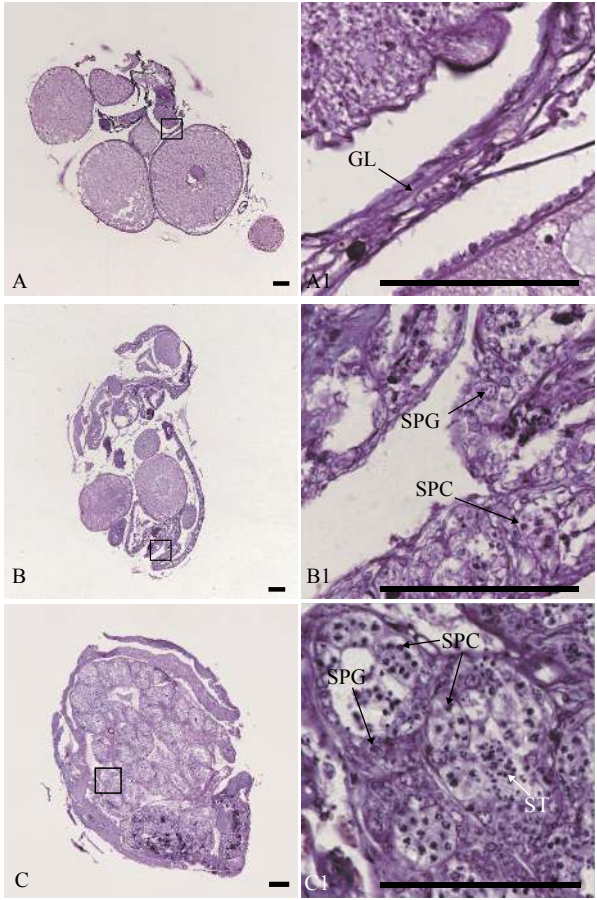


图 3 34月龄黄鳝的不同性别状态性腺组织结构

Fig. 3 Gonadal histology of 34-month-old ricefield eels of different sexual stages

A. 雌性(体长34.5 cm, 体重28.6 g); B. 间性(体长26 cm, 体重19.9 g); C. 雄性(体长34 cm, 体重24.9 g); A1、B1和C1为A、B和C图方框区域放大; GL. 生殖褶; SPC. 精母细胞; SPG. 精原细胞; ST. 精子细胞; 图中标尺为100 μm

A. female (body length: 34.5 cm, weight: 28.6 g); B. intersex (body length: 26 cm, body weight: 19.9 g); C. male (body length: 34 cm, body weight: 24.9 g). A1, B1 and C1 are higher magnification of the boxed areas in A, B and C, respectively. GL. gonadal lamellae; SPC. spermatocyte; SPG. spermatogonia; ST. spermatid; Scale bar=100 μm

细胞上也有PCNA免疫信号, 但次级精母细胞上未观察到PCNA免疫信号(图 6C1和C2)。

以PBS代替PCNA抗体, 免疫组织化学分析结果表明, 黄鳝性腺切片中未呈现任何免疫阳性信号(图 6D1和D2), 提示上述黄鳝性腺切片中PCNA免

疫信号具有特异性。

3 讨论

3.1 黄鳝性转变与年龄、体长、体重的关系

已有研究表明, 黄鳝在2龄之前都为雌性, 2龄

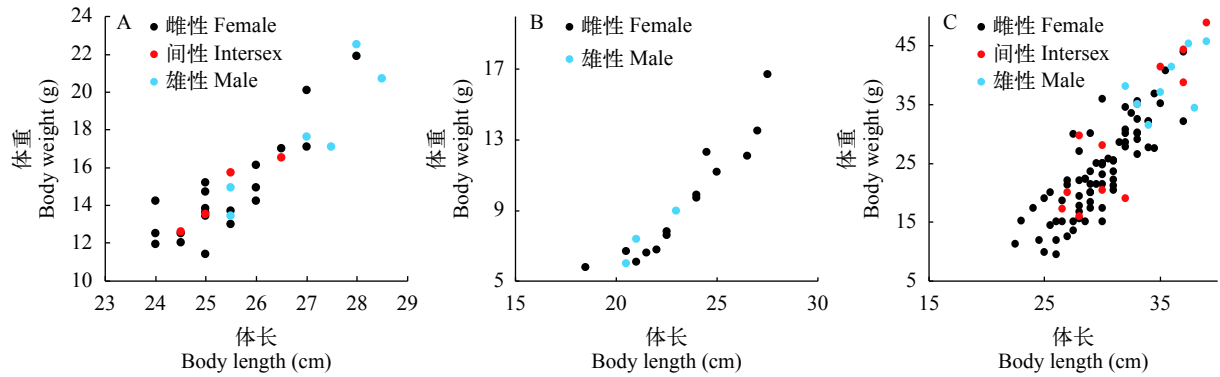


图 4 不同年龄段黄鳝的性别与体重和体长的关系

Fig. 4 The relationship between sex, body weight, and body length of ricefield eels at different ages

A. 5月龄黄鳝; B. 12月龄黄鳝; C. 34月龄黄鳝。黑点、红点和蓝点分别表示雌性、间性和雄性

A. 5-month-old; B. 12-month-old; C. 34-month-old. The black, red, and blue dots represent female, intersexual, and male fish, respectively

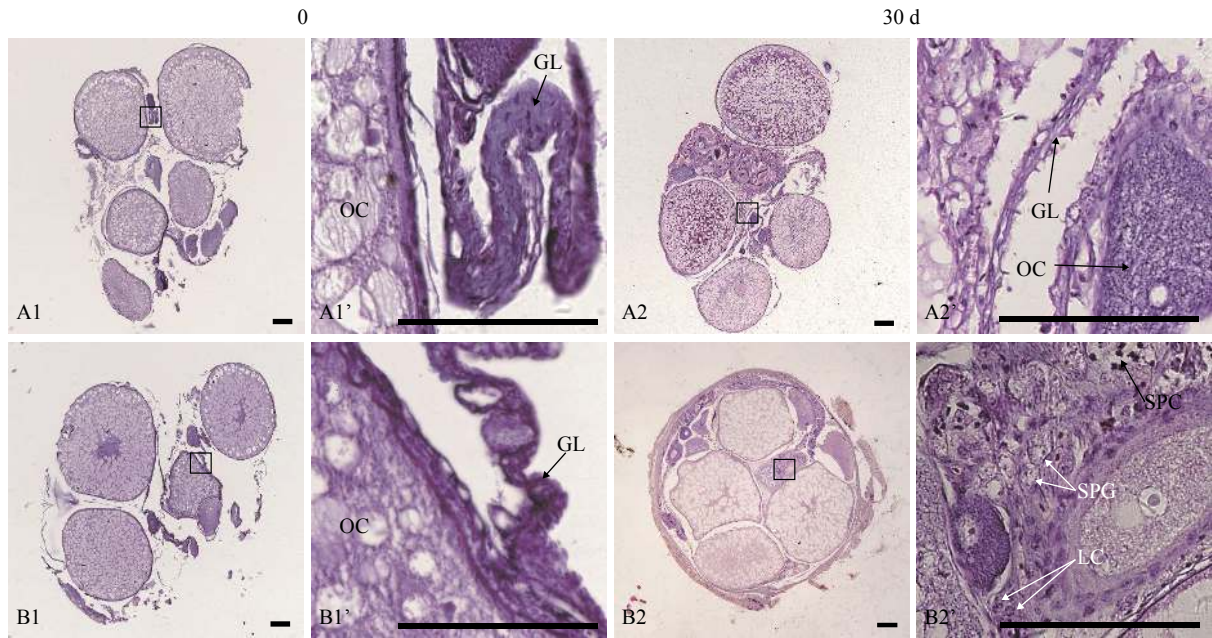


图 5 两条34月龄黄鳝的性腺组织结构在跟踪1个月前后的对比

Fig. 5 Tracing for gonadal changes of two 34-month-old ricefield eels in a one-month period

性腺组织通过活体解剖技术取出, 常规石蜡组织切片后HE染色; A和B分别表示两个黄鳝个体, 其后面的阿拉伯数字表示不同的取样点, 即1为第1天时样品, 2为第30天时样品。A1'、A2'、B1'和B2'分别为A1、A2、B1和B2中方框区域放大。黄鳝A 实验开始时为雌性(体长29.5 cm, 体重16.3 g), 30d后仍为雌性(体长30 cm, 体重16.8 g); 黄鳝B实验开始时为雌性(体长32 cm, 体重26.2 g), 30d后已发育为间性(体长33.5 cm, 体重29.5 g); OC. 卵母细胞; GL. 生殖褶; LC. 间质细胞; SPC. 精母细胞; SPG. 精原细胞。标尺为100 μm

The gonadal tissues were collected by biopsy technique, and the paraffin embedded tissues were sectioned for HE staining. A and B represent two different individual ricefield eels, respectively, and the arabic numerals behind represent different sampling time, with 1 for the first day and 2 for the 30th day. A1', A2', B1' and B2' are higher magnification of the boxed areas in A1, A2, B1, and B2, respectively. A was female on the first day (body length: 29.5 cm, body weight: 16.3 g), and remained as female until the 30th day (body length: 30 cm, body weight: 16.8 g). B was female on the first day (body length: 32 cm, weight: 26.2 g), and developed into intersex on the 30th day (body length: 33.5 cm, body weight: 29.5 g). OC. oocyte; GL. gonadal lamellae; LC. leydig cell; SPC. spermatocyte; SPG. spermatogonia. Scale bar=100 μm

后开始性转变^[6, 13]。本文分析了实验室内从受精卵或幼苗养殖至不同年龄黄鳢的性腺发育状况, 发现

在5月龄黄鳢中就存在有间性和雄性个体, 提示实验室内养殖的黄鳢在5月龄之前就已经开始性转变,

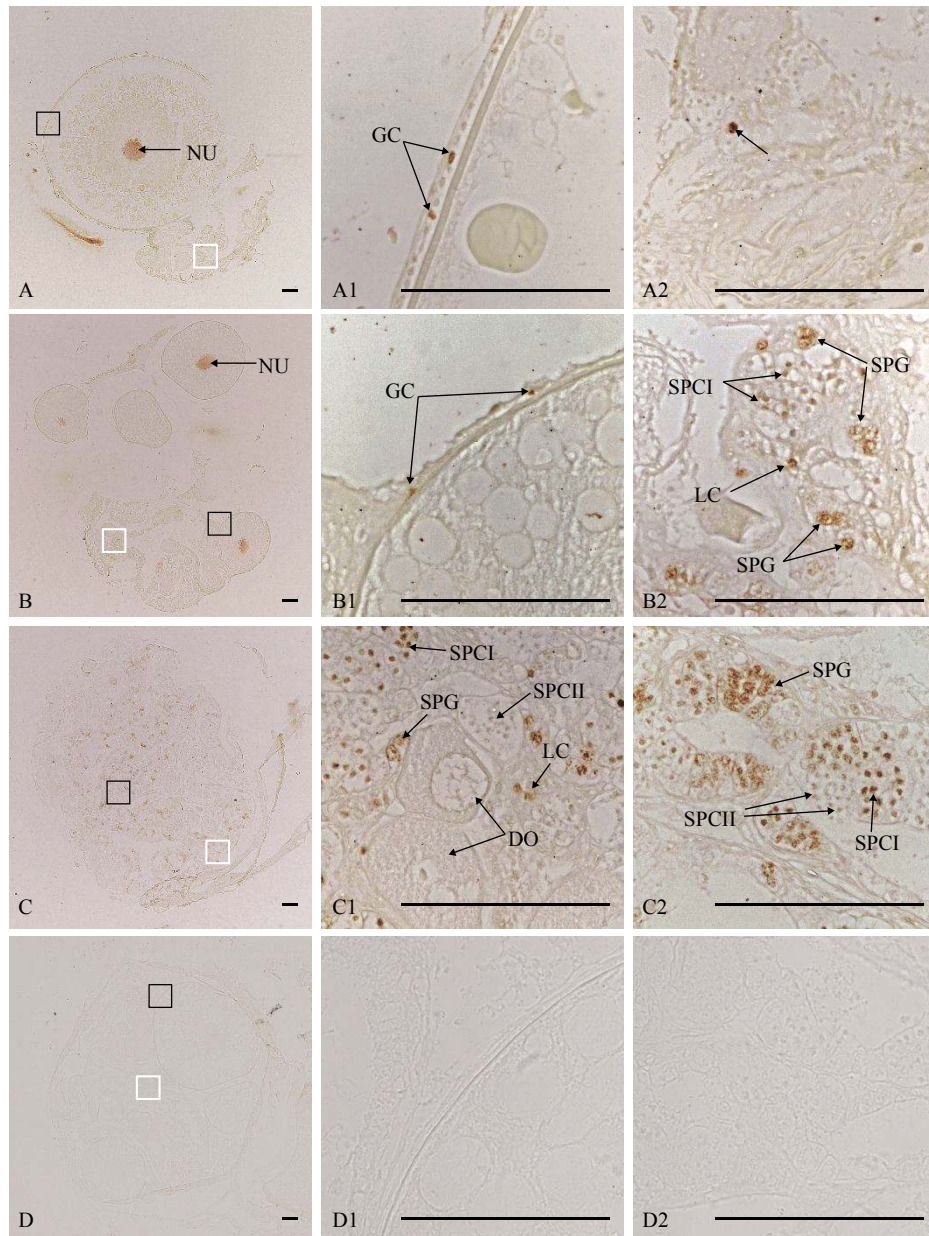


图6 黄鳢性转变过程中性腺PCNA免疫组织化学分析

Fig. 6 PCNA immunohistochemistry in gonads of ricefield eels during sex change

34月龄黄鳢不同性别状态的性腺切片先后与一抗(PCNA鼠单抗)和二抗(EliVision™ Super试剂盒)反应后, 用DAB显色。阴性对照以PBS代替PCNA抗体, 其余操作一致; A. 雌性阶段(体长为31 cm, 体重为25.3 g); B. 间性早期阶段(体长31.5 cm, 体重27.9 g); C. 间性晚期阶段(体长32 cm, 体重29.7 g); D. 阴性对照, 性腺组织与B同; A1、B1、C1和D1分别是A、B、C和D中对应黑方框放大, A2、B2、C2和D2分别是A、B、C和D中对应白方框放大; NU. 细胞核; DO. 退化的卵母细胞; GC. 颗粒细胞; LC. 间质细胞; SPCI. 初级精母细胞; SPCII. 次级精母细胞; SPG. 精原细胞; 标尺为100 μm

The gonadal sections of a 34-month-old ricefield eel at different sexual stages were immunoreacted with the primary antibody (PCNA mouse monoclonal antibody) and the secondary antibody (EliVision™ Super kit), visualized by DAB chromogen, and photographed by a Nikon microscope (E800, Nikon, Japan). In the negative control, PBS was used in place of PCNA mouse monoclonal antibody. A. female stage (body length: 31 cm, body weight: 25.3 g); B. early intersexual stage (body length: 31.5 cm, body weight: 27.9 g); C. late intersexual stage (body length: 32 cm, body weight: 29.7 g); D. negative control with the same gonadal tissue as B. A1, B1, C1 and D1 are higher magnification of the black-line boxed areas in A, B, C and D, respectively. A2, B2, C2 and D2 are higher magnification of the white-line boxed areas in A, B, C and D, respectively. NU. nucleus; DO. degenerate oocyte; GC. granulosa cell; LC. leydig cell; SPCI. primary spermatocyte; SPCII. secondary spermatocyte; SPG. spermatogonia. Scale bar=100 μm

比之前的报道至少提前了1.5年。

在实验室养殖的5月龄、12月龄和34月龄的黄鳢中,都有一定比例的不同性别的个体,表明在同一个群体中黄鳢性转变年龄存在个体差异。刘修业等^[13]也发现3—5龄黄鳢性别处于过渡期,性别过渡期达2年之久。那么,黄鳢在什么年龄完成性转变,即在什么年龄全部变为雄性?对于这个问题,目前仍没有定论。王良臣等^[14]在野外采集的6龄和7龄黄鳢样品中没有发现雌性和间性个体,全部为雄性。但是,本实验室有3条养殖8年的黄鳢,其性腺仍处于间性阶段(数据未显示)。这些不同研究之间黄鳢性别与年龄关系的差异可能是因为实验黄鳢生存环境不同所致,而同一群体中黄鳢个体性转变年龄的差异可能是由遗传因素所决定的^[8]。

除年龄外,黄鳢性别与体长关系也比较密切^[13]。与其他研究类似,本研究表明,在5月龄和34月龄黄鳢中,间性和雄性个体较雌性个体偏大。在5月龄和34月龄黄鳢中,间性黄鳢最小个体体长分别为24.5和26.5 cm,比较接近鄱阳湖和洞庭湖黄鳢性转变的临界体长30 cm^[21, 22]和粤港地区黄鳢性转变临界体长20 cm^[7],而与天津^[14]和信阳地区^[23]黄鳢性转变临界体长(40.0 cm左右)差异较大。与万隆地区黄鳢性转变临界体长(16 cm左右)^[6]也差异较大。这些不同地区黄鳢性转变临界体长差异可能与所在区域的纬度和气候条件相关,低纬度地区,黄鳢生长发育较快,性成熟早,发生性转变也早,性转变时体长也较小^[11]。

本研究所观察的12月龄黄鳢的体重和体长比5月龄偏小,这可能是由于这批黄鳢在7月龄时发生疾病,出现大规模死亡现象,摄食和生长都受到严重影响。与5月龄和34月龄雄性黄鳢不同,12月龄黄鳢的雄性个体较雌性偏小,导致这些12月龄雄性黄鳢个体偏小的原因目前仍不清楚。Chan和Phillips^[7]曾报道有一些小个体的雌性黄鳢卵巢中卵母细胞数量少,并有明显的精巢组织出现,推测它们的雌性阶段很短。因此,由这些小个体的雌鱼性转变产生的雄鱼,其个体也应该偏小。

3.2 产卵并非雌鳢性转变的必经事件

研究者通常认为,雌性黄鳢的性转变是在经过一次或多次性成熟产卵后发生的^[7, 11, 24, 25]。本研究分析了实验室内从受精卵或幼苗养殖至不同年龄黄鳢的性腺发育状况。在养殖过程中,没有发现黄鳢有产卵现象或繁殖行为。前期研究表明,实验室内养殖的雌性黄鳢1龄时可发育至性成熟^[19]。这些实验室内养殖的雌性黄鳢之所以不产卵,可能是由于室内养殖条件不适合其产卵和繁殖。性腺组织

切片结果表明,在94条34月龄黄鳢中,有12条间性个体,占比12.8%;30条5月龄黄鳢中,有4条间性个体,占比13.3%,这些结果提示,雌性黄鳢不经过产卵过程也可以发生性转变。另外,本研究对36条34月龄雌性黄鳢的性腺发育进行了跟踪观察,发现16.7%的黄鳢在这一跟踪过程中发生性转变,进一步表明,产卵并不是雌性黄鳢性转变必须要经历的事件。

就目前所掌握的资料来看,“黄鳢产卵后性转变”的观点最早由Chan和Phillips^[7]于1967年提出的。但是,早在1963年,Liem^[6]从黄鳢受精卵孵化出黄鳢幼苗后养殖,第30个月取样时发现雌性和间性黄鳢个体,第36个月时取样发现有雌性、间性和雄性黄鳢个体。但是,该论文没有说明这些30月龄的间性黄鳢是否在实验室内经历了产卵过程,因此,不能判断产卵过程是否是黄鳢性转变必经事件。在2004年,周秋白等^[21]报道,怀卵未产雌鳢经过1周年饲养后有11%的个体转变为间性。这些结果似乎与“黄鳢产卵后性转变”的观点不一致。但是,该论文并没有提供这些怀卵未产雌鳢的生物学参数和年龄等信息,也没有提及这些怀卵未产雌鳢是否初次性成熟,之前的年份是否曾经历产卵过程,因此,论文的讨论部分并没有对“黄鳢产卵后性转变”的观点提出质疑^[21]。

那么,雌性黄鳢产卵后是否就进入间性阶段发育?答案是否定的。周秋白等^[21]发现,已产卵黄鳢在第二年的雌性比例仍占51.1%。因此,雌性黄鳢产卵过程与性转变启动并没有必然的因果关联。

黄鳢性转变的诱因目前仍不清楚。研究表明,环境因素如温度和社会等级变化等影响鱼类性别决定和分化^[26, 27]。应激激素皮质醇可能介导了温度诱导鱼类雄性化和社会行为诱导雌雄同体鱼类性转变的过程^[28]。在雌性先熟的性转变鱼类斜带石斑鱼中,腹腔注射皮质醇可诱导其从雌性转变为雄性^[29]。因此,有关环境因素和皮质醇等与黄鳢性转变的关联值得进一步探讨。

3.3 黄鳢是否有原发性雄性

研究发现,同属合鳃目的美洲花鳢也具有先雌后雄的性转变现象,这种鱼的雄性有2种来源,即原发性雄性(不经雌性阶段直接发育为雄性)和次发性雄性(雌鱼经性转变发育成雄鱼)^[17, 30]。次发性雄鱼精巢是在卵巢结构基础上改造而来,因此精巢为单个,但是原发性雄鱼精巢是成对存在的^[17]。

在黄鳢种群中,是否存在原发性的雄性可能因地理位置而异。Liem^[30]报道,在泰国、马来西亚沙捞越、马来半岛和日本冲绳的黄鳢样品中发现原

发性雄性,而在印度尼西亚万隆、日本Uda River和中国北碚的黄鳝样品中没有发现原发性雄性。与美洲花鳝原发性雄性一样,黄鳝原发性雄性的精巢也是成对存在,由两个精巢叶和连接两者的结缔组织构成,结缔组织中央有一条精巢静脉,两侧各有一条输精管,分别与两侧的精巢叶对应;而次发性雄性黄鳝的精巢保留了卵巢的解剖结构,原来的卵巢腔转变为精巢的输精管,原来的输卵管的管腔仍存在,但可能在精巢中不行使功能。

Chan和Phillips^[7]报道了香港和广东地区的黄鳝精巢有2种结构类型,一种为full-cord,另一种为half-cord。前者整个生殖褶充满精巢小叶,而后者精巢小叶仅分布在生殖褶内侧。尽管Liem^[30]推测含full-cord精巢的黄鳝为原发性雄性,但是这种推测似乎缺乏证据,因为Chan和Phillips^[7]在文中并没有提出half-cord和full-cord两种精巢在解剖结构上有任何差异。

本研究在5月龄和12月龄黄鳝中都发现雄性个体,占比分别为17.6%和20.0%,比例较接近。组织切片分析表明,这些雄性个体精巢中没有任何退化的卵母细胞,但解剖结构上与卵巢类似,即有2条生殖褶,2个性腺内腔及一个性腺外腔^[8],这与Liem^[30]所描述的黄鳝原发性雄性精巢结构不同。因此,本研究推测这些5月龄和12月龄雄性黄鳝也可能是通过性转变所产生的,其性转变发生在卵巢发育早期阶段。当然,另一种可能性也不能完全排除,即这些5月龄和12月龄雄性黄鳝是原发性的雄性,特别是12月龄的雄性黄鳝,其个体较雌性黄鳝偏小,与雌性转化为雄性的自然性转变过程中个体大小变化趋势存在矛盾。如果这些雄性黄鳝是原发性雄性,那么其精巢的早期发生与卵巢类似,而与Liem^[30]所描述的黄鳝原发性雄性不同。因此,中国本土黄鳝是否存在原发性雄性仍需进一步探讨。

3.4 黄鳝性转变过程中精巢组织细胞的发生

黄鳝从雌性转变为雄性的过程是性腺中的卵巢组织不断被精巢组织所取代的过程^[7],因此性转变过程伴随着精巢组织体细胞和生殖细胞的增殖。黄鳝精巢体细胞和生殖细胞发生于性腺生殖褶内侧,其中的性原细胞(Gonocyte)在雌性阶段就已存在,性转变开始时,这些性原细胞增殖,产生精原细胞,同时间质细胞也分化发育,形成Leydig细胞^[7, 8]。在黄鳝间性早期性腺增厚的生殖褶中,本研究也观察到早期雄性生殖细胞包括精原细胞和精母细胞,及精巢间质细胞。这些间质细胞呈卵圆形,染色质浓缩,与核膜相邻,存在于精小囊之间^[31]。但是,由于缺乏相应细胞的分子标记,黄鳝间性性

腺中性原细胞、精原细胞和间质细胞等的鉴定主要依据细胞形态和细胞在组织中所处的位置,黄鳝性逆转初期性腺组织细胞学变化仍很不清晰。

增殖细胞核抗原(Proliferating Cell Nuclear Antigen, 简称PCNA)是真核细胞DNA合成所必需的一种核蛋白,在不同物种间具有高度的保守性,已被用作多种组织中细胞增殖的生物标志物^[32-34]。本研究应用免疫组织化学方法,分析了卵巢、间性早期和间性晚期黄鳝性腺中PCNA免疫活性分布。发现PCNA免疫活性信号分布在黄鳝卵巢和间性早期性腺的卵母细胞,间性晚期性腺的精原细胞和初级精母细胞等生殖细胞,及卵巢中部分颗粒细胞中,这与上述这些性腺细胞具有较强的增殖能力相一致,进一步提示商品化的PCNA抗体可用于分析黄鳝性腺细胞增殖。

在间性早期黄鳝性腺的生殖褶中,除精原细胞和初级精母细胞为PCNA免疫阳性外,精巢间质细胞也含有PCNA免疫阳性信号。在美洲花鳝性转变早期的性腺结缔组织中,精巢间质细胞也呈现很强的PCNA免疫信号^[17]。这些结果提示,精巢间质细胞和精原细胞的增殖可能与黄鳝性转变的启动密切相关。但是,这些间质细胞和精原细胞的起源仍有待进一步研究。因此,黄鳝性转变早期性腺中精巢体细胞和生殖细胞相关分子标记的开发,结合PCNA免疫组化分析,将能更好地揭示这些精巢体细胞和生殖细胞的动态变化,有助于阐明黄鳝性转变调控机制。

致谢:

感谢中山大学生命科学学院崔鑫、李曦、张澜馨、刘敏琦、何智、许星和张有为同学协助实验黄鳝饲养管理。

参考文献:

- [1] Li X Y, Gui J F. Diverse and variable sex determination mechanisms in vertebrates [J]. *Science China Life Sciences*, 2018, **61**(12): 1503-1514.
- [2] Mei J, Gui J F. Genetic basis and biotechnological manipulation of sexual dimorphism and sex determination in fish [J]. *Science China Life Sciences*, 2015, **58**(2): 124-136.
- [3] Zhou L, Gui J F, Jian-Kang Liu: A pioneer of sex determination studies in vertebrates [J]. *Protein & Cell*, 2016, **7**(1): 1-3.
- [4] Cheng H H, Guo Y Q, Yu Q X, *et al.* The rice field eel as a model system for vertebrate sexual development [J]. *Cytogenetic and Genome Research*, 2003, **101**(3-4): 274-

- 277.
- [5] Liu C K. Rudimentary hermaphroditism in the symbranchoid eel *Monopterus javanensis* [J]. *Sinensia*, 1944(15): 1-8.
- [6] Liem K F. Sex reversal as a natural process in the synbranchiform fish *Monopterus albus* [J]. *Copeia*, 1963(2): 303-312.
- [7] Chan S T H, Phillips J G. The structure of the gonad during natural sex reversal in *Monopterus albus* (Pisces: Teleostei) [J]. *Journal of Zoology*, 1967, **151**(1): 129-141.
- [8] Chan S T H, Wai-Sum O, Tang F, *et al.* Biopsy studies on the natural sex reversal in *Monopterus albus* (Pisces: Teleostei) [J]. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 1972(167): 415-421.
- [9] Liu J K, Gu G Y. Morphological changes in the gonad of *Monopterus* during sex reversal [J]. *Science*, 1950(3): 91. [刘建康, 顾国彦. 鳝鱼性别逆转时生殖腺组织的改变 [J]. 科学, 1950(3): 91.]
- [10] Tao Y X, Lin H R. Studies on the natural sex reversal of paddyfield eel, *Monopterus albus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1991, **3**(15): 274-278. [陶亚雄, 林浩然. 黄鳝自然性反转的研究 [J]. 水生生物学报, 1991, **3**(15): 274-278.]
- [11] Mei W X, Cao Y L, Li R L, *et al.* A preliminary observation on sex reversal of the mud eel *Monopterus albus* [J]. *Journal of Zhejiang College of Fisheries*, 1993, **12**(1): 53-58. [梅文骧, 操应龙, 李蕊蕾, 等. 黄鳝 *Monopterus albus* 性转变的探讨 [J]. 浙江水产学院学报, 1993, **12**(1): 53-58.]
- [12] Cheng C, Qu X C. Advances of sex reversal of *Monopterus albus* [J]. *Hunan Agricultural Sciences*, 2010(1): 121-124. [程翠, 曲宪成. 黄鳝性逆转研究进展 [J]. 湖南农业科学, 2010(1): 121-124.]
- [13] Liu X Y, Wang L C. The relationship between the sex and age, body length, or body weight, and the histological changes in gonadal tissues of the ricefield eel *Monopterus albus* [J]. *Freshwater Fisheries*, 1987(6): 12-14. [刘修业, 王良臣. 黄鳝性别与年龄、体长、体重等的关系及性腺的组织变化 [J]. 淡水渔业, 1987(6): 12-14.]
- [14] Wang L C, Liu X Y, Yan J B, *et al.* Study on relationships among biological parameters of the ricefield eel, *Monopterus albus* [J]. *Transactions of the Chinese Ichthyological Society*, 1985(4): 147-153. [王良臣, 刘修业, 阎家本, 等. 黄鳝生物学因素关系的研究 [J]. 鱼类学论文集, 1985(4): 147-153.]
- [15] Bravo R, Celis J E. A search for differential polypeptide synthesis throughout the cell cycle of HeLa cells [J]. *Cell Biology*, 1980, **84**(3): 795-802.
- [16] Bravo R, Fey S J, Bellatin J, *et al.* Identification of a nuclear and of a cytoplasmic polypeptide whose relative proportions are sensitive to changes in the rate of cell proliferation [J]. *Experimental Cell Research*, 1981, **136**(2): 311-319.
- [17] Mazzone T, Lo Nostro F, Antoneli F, *et al.* Action of the metalloproteinases in gonadal remodeling during sex reversal in the sequential hermaphroditism of the teleostei fish *Synbranchus marmoratus* (Synbranchiformes: Synbranchidae) [J]. *Cells*, 2018, **7**(5): 34.
- [18] Lin C J, Wu G C, Dufour S, *et al.* Activation of the brain-pituitary-gonadotropic axis in the black porgy *Acanthopagrus schlegelii* during gonadal differentiation and testis development and effect of estradiol treatment [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2019(281): 17-29.
- [19] He Z, Li Y X, Zhang B Y, *et al.* The initial ovarian development and the expression of some related genes in ricefield eel, *Monopterus albus* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, **37**(4): 536-544. [何智, 李依雪, 张碧鱼, 等. 黄鳝卵巢初次发育成熟及相关基因表达分析 [J]. 水产学报, 2013, **37**(4): 536-544.]
- [20] Tang F. A study on the relationship between steroid hormones and natural sex reversal in the ricefield eel, *Monopterus albus* [D]. Hongkong: the University of Hong Kong, 1972: 68-69.
- [21] Zhou Q B, Zhang Y P, Li X H, *et al.* A preliminary study on the relationship between body length, body weight and sex ratio of ricefield eels in Poyang Lake [J]. *Freshwater Fisheries*, 2004, **34**(4): 24-26. [周秋白, 张燕萍, 李新华, 等. 鄱阳湖区黄鳝体长、体重与性比关系初步研究 [J]. 淡水渔业, 2004, **34**(4): 24-26.]
- [22] Wang W B, Zeng B P, Luo Y S, *et al.* On relationship between body length, body weight and sex of *Monopterus albus* in Dongting Lake basin [J]. *Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences)*, 2008, **34**(4): 469-473. [王文彬, 曾伯平, 罗玉双, 等. 洞庭湖区黄鳝性别与体长及体重的关系 [J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2008, **34**(4): 469-473.]
- [23] Lun F, Li Z, Lin W, *et al.* Study on the total body length, body weight and gonadal development of the ricefield eel, *Monopterus albus* [J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2018(11): 215-217, 259. [伦峰, 李峥, 林伟, 等. 黄鳝全长、体重与性腺发育的研究 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2018(11): 215-217, 259.]
- [24] Chen L L, Xiao Y M, Liu Y. A report about the new development of gonad in *Monopterus albus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, **30**(5): 621-624. [陈丽莉, 肖亚梅, 刘筠. 黄鳝一种新的生殖腺发育状况报道 [J]. 水生生物学报, 2006, **30**(5): 621-624.]
- [25] Xiao Y M, Chen L L, Cheng S, *et al.* Transformation of the germ stem cells in the gonad development of sex reversal in *Monopterus albus* [J]. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2007(3): 196-204. [肖亚梅, 陈丽莉, 陈松, 等. 黄鳝生殖干细胞在性逆转生殖发育过程中的变化 [J]. 分子细胞生物学报, 2007(3): 196-204.]
- [26] 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.
- [27] Stelkens R B, Wedekind C. Environmental sex reversal, trojan sex genes, and sex ratio adjustment: conditions and population consequences [J]. *Molecular Ecology*, 2010, 19(4): 627-646.
- [28] Goikoetxea A, Todd E V, Gemmell N J. Stress and sex: does cortisol mediate sex change in fish [J]? *Reproduction*, 2017, 154(6): R149-R160.
- [29] Chen J, Peng C, Yu Z, *et al.* The administration of cortisol induces female-to-male sex change in the protogynous orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides* [J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2020(11): 12.
- [30] Liem K F. Geographical and taxonomic variation in the pattern of natural sex reversal in the teleost fish order Synbranchiformes [J]. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 1968(156): 225-238.
- [31] Vázquez G R, Cuña R H D, Meijide F J, *et al.* Spermatogenesis and changes in testicular structure during the reproductive cycle in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes) [J]. *Acta Zoologica*, 2011, 93(3): 338-350.
- [32] Tománek M, Chronowska E. Immunohistochemical localization of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the pig ovary [J]. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 2006, 44(4): 269-274.
- [33] Quagio-Grassiotto I, Grier H G, Mazzoni T S, *et al.* Activity of the ovarian germinal epithelium in the freshwater catfish, *Pimelodus maculatus* (Teleostei: Ostariophysi: Siluriformes): germline cysts, follicle formation and oocyte development [J]. *Journal of Morphology*, 2011, 272(11): 1290-1306.
- [34] Guzmán J M, Luckenbach J A, Yamamoto Y, *et al.* Expression profiles of fish-regulated ovarian genes during oogenesis in *Coho salmon* [J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e114176.

NATURAL SEX CHANGE OF THE “VIRGIN” FEMALE RICEFIELD EEL *MONOPTERUS ALBUS*

FAN Miao¹, YANG Wei¹, SUN Shu¹, LI Zhong^{2,3}, ZHANG Li-Hong¹ and ZHANG Wei-Min¹

(1. Institute of Aquatic Economic Animals, School of Life Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, China;

2. Zhongshan Industrial Breeding Base of Ricefield Eels, Xiantao 433012, China; 3. Yangtze River Fisheries Research Institute of Chinese Academy, Fishery Sciences, Wuhan 430223, China)

Abstract: Ricefield eel (*Monopterus albus* Zuiew) is a protogynous hermaphrodite teleost that naturally undergoes a sex change from a functional female to a functional male through an intersexual phase, and it is becoming an important aquaculture species in China. It is generally believed that the sexual change of ricefield eels occurs after spawning, which may be one of the major obstacles in the massive artificial breeding of this species. In order to investigate whether spawning is necessary for the process of female to male sexual change, we performed routine hematoxylin-eosin staining on gonads of ricefield eels of different ages raised in laboratory from fertilized eggs or larvae, traced the gonadal developmental changes of 34-month-old female ricefield eels in a one-month period through biopsy examination, and examined the proliferation of gonadal cells with Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunohistochemistry in gonads of ricefield eels at different sexual stages. No spawning activities or reproductive behaviors of experimental ricefield eels were observed during the study. The results showed that the intersexual and/or male fish in 5-month-old, 12-month-old (1-year-old), and 34-month-old (3-year-old) ricefield eels, were 4 (12.5%) of intersexual and 6 (20.0%) of male observed in total 30 of 5-month-old fish, 0 of intersexual and 3 (17.6%) of male in total 17 of 12-month-old (1-year-old) fish, and 12 (12.8%) of intersexual and 8 (8.5%) of male in total 94 of 34-month-old (3-year-old) fish, respectively. In addition, in 36 female ricefield eels of 34 months old, 6 females (16.7%) started sexual change and developed into intersexual stages within one month. Obvious PCNA immunostaining was observed in the connective tissues of gonadal lamellae at the initial intersexual stage, and PCNA positive cells are presumably the interstitial cells, spermatogonia, and primary spermatocytes. Collectively, the present study suggests that spawning is not a necessary process for female to male sexual change in ricefield eels, and the earliest event for gonadal sex change seems to involve the proliferation of interstitial cells and spermatogonia in connective tissues of thickened gonadal lamellae. This study helps to further understand and unravel mechanisms underlying the natural sex change of ricefield eels.

Key words: Ricefield eel *Monopterus albus* Zuiew; Sexual change; Gonadal histology; Biopsy; Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)