

醋酸洋红染色技术在大菱鲆幼鱼 生理性别鉴定中的应用

韩伟国^{1,2} 刘新富² 孟 振² 温海深¹ 雷霖霖^{2*}

(¹中国海洋大学水产学院, 266003)

(²青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 266071)

摘 要 综合运用肉眼观察、活体压片-醋酸洋红染色和组织切片-H. E. 染色 3 种方法对大菱鲆 *Scophthalmus maximus* L. 幼鱼进行性别鉴定。结果表明, 在所有采集的 1 217 尾全长 8.3~21.5 cm、体重 9.0~183.9 g 的大菱鲆幼鱼样品中, 体重 >90 g 的 269 尾幼鱼和体重 10~90 g 的 790 尾幼鱼, 可用肉眼直接观察鉴定性别; 体重 10~90 g 的另外 154 尾幼鱼, 可采用活体压片方法鉴定性别; 体重 <10 g 的 4 尾幼鱼, 性腺难以剥离, 则需组织切片的方法鉴定性别。对活体压片性别鉴定结果进行组织切片抽样验证表明, 体重 >10 g 的幼鱼, 均可以采用活体压片方法准确地鉴定出性别, 其准确率可以达到 100%。本研究验证了采用活体压片-醋酸洋红染色技术在大菱鲆幼鱼生理性别鉴定中具有很高的准确性, 它不仅有利于全雌育种中对幼鱼快速进行性别鉴定, 而且可以应用于商品苗性别的快速鉴定。

关键词 大菱鲆 性别鉴定 活体压片 醋酸洋红

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2011)06-0037-06

Application of the aceto-carmin technique for the identification of phenotypic sex in turbot *Scophthalmus maximus* L. young fish

HAN Wei-guo^{1,2} LIU Xin-fu² MENG Zhen²

WEN Hai-shen¹ LEI Ji-lin^{2*}

(¹ College of Fisheries, Ocean University of China, Qingdao 266003)

(² Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, 266071)

ABSTRACT In this study three combined methods including microscopic examination, aceto-carmin staining of squash mounting and haematoxylin-eosin staining of histology section of the gonads were adopted to determine the phenotypic sex of turbot *Scophthalmus maximus* L. young fish. Among the 1 217 individuals of turbot young fish (total length 8.3~21.5 cm, wet body weight 9.0~183.9 g), all of the 269 individuals weighting more than 90 g and 790 individuals weighting between 10~90 g could be unambiguously sexed by macroscopic examination of

国家鲆鲽类产业技术体系建设专项资金(nycytx-50-G02)和农业公益性行业科研专项(nyhyzx07-046)共同资助

* 通讯作者。E-mail:leijl@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85821347

收稿日期:2011-04-11;接受日期:2011-05-16

作者简介:韩伟国(1986-),男,硕士研究生,主要从事海水鱼类培养殖和遗传育种方面的研究。E-mail:hwg1123@163.com

their gonads, whereas the remaining of 154 individuals weighting between 10~90 g and 4 individuals weighting less than 10 g were identified using squash mount preparation and histology section, respectively. The accuracy of the squash mount observation of young fish weighting more than 10 g is up to 100 percent, which was validated by classic histology section. With the validated efficiency and accuracy in the sexing of turbot young fish, the squash mount technique holds out the prospect of considerable improvement in the development of the production technique of all female turbot juvenile.

KEY WORDS Turbot Sexing Squash mount Aceto-carmin

大菱鲆 *Scophthalmus maximus* 是目前世界上养殖范围最广、规模最大的鲆鲽类之一,欧洲年养殖产量达 8 000 t,国内最高年产量达 5 万余 t,年产值逾 40 亿元(雷霖霖 2003、2005)。与许多其他鲆鲽类一样(李忠红等 2009;刘永新等 2008;田永胜等 2008),养殖大菱鲆生长速度的雌、雄差异显著,孵化后 8 月龄时雌鱼的生长速度就超过雄鱼(Imsland *et al.* 1997),20 月龄时雌鱼体重可以达到 1 800 g,而雄鱼受性成熟影响体重达到 1 000 g 后就增长缓慢(Cal *et al.* 2006)。因此,培育和养殖全雌苗种,充分利用雌鱼的生长优势以提高养殖效率,成为当前大菱鲆养殖研究的一个热点。

迄今为止,大菱鲆雌核发育(Piferrer *et al.* 2004;孟振等 2010)、激素诱导性反转以及温度对性别分化的影响(Haffray *et al.* 2009)等全雌苗种繁育技术相关方面的研究都取得了一定进展,但是关键环节之一的性别决定机制仍然没有确定,还需要借助性别鉴定等技术进行深入研究。Guerrero 等(1974)最早提出的性腺活体压片-醋酸洋红染色(以下简称活体压片)方法,是一种成本低廉、操作简便和准确率较高的稚幼鱼性别鉴定技术,先后被许多学者在多种鱼类的性别研究中所采用(Arslan *et al.* 2004;Gao *et al.* 2010;Haffray *et al.* 2009;Haniffa *et al.* 2004;Magerhans *et al.* 2010;Menu *et al.* 2005;Wang *et al.* 2008;Wassermann *et al.* 2002),然而至今很少有人对对象品种的适用规格和鉴定结果的准确性进行验证(Menu *et al.* 2005;Wassermann *et al.* 2002),尤其在大菱鲆性别鉴定上的应用,至今国内外尚无报道。本研究通过组织切片、活体压片法和解剖肉眼观察 3 种方法的综合运用,不仅验证了活体压片法在大菱鲆幼鱼性别鉴别中的有效性和准确性,而且提出了适用该技术幼鱼的规格,可为今后大菱鲆全雌苗种繁育技术相关研究提供准确的技术参数。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

试验材料于 2010 年 11 月 27~30 日取自青岛通用水产养殖有限公司,对 1 217 尾全长 8.3~21.5 cm、体重 9.0~183.9 g 的大菱鲆幼鱼逐尾进行了性别鉴定。性腺活体染色试剂为 1%醋酸洋红溶液,根据 Wassermann 等(2002)的方法进行配制并做适当调整:将 45 ml 冰醋酸加入 55 ml 蒸馏水中配制成 45%醋酸溶液,煮沸后缓缓加入 1 g 洋红,搅拌均匀后加入 1 颗生锈铁钉,煮沸 10 min,冷却后过滤,贮存于棕色瓶中待用。

1.2 方法

试验鱼用 0.15 ml/L 的丁香酚深度麻醉,测量并记录全长(cm)和体重(g),然后解剖,将包括肝脏和消化道在内的游离内脏团整体取出,可以清楚看到依附于外侧体壁的淡黄色细条型膀胱(图版 I-B),幼鱼性腺位于后部膀胱与外侧体壁之间。对于肉眼可以清楚区分卵巢和精巢的幼鱼,直接确定性别和用 Canon A460 数码相机拍照,并随机抽取卵巢和精巢各 5 个进行活体压片观察(雌鱼全长 17.1~21.5 cm,体重 98.2~183.9 g;雄鱼全长 17.6~20.4 cm,体重 97.4~151.7 g)。对于肉眼不能清楚区分卵巢和精巢的幼鱼,用镊子小心将 1

对性腺取下,从性腺顶端连接处分开,将一叶性腺放置在干净的载玻片上,用解剖剪将性腺剪成厚约 1~4 mm 的薄片,加上醋酸洋红染液数滴,用干净的盖玻片盖住,轻轻挤压,使性腺组织破裂和分散,然后转移到显微镜下(OLYMPUS DP72,200×)进行性别鉴定和拍照;将另外一叶性腺放入波恩氏固定液中固定,带回实验室进行石蜡包埋、组织切片(厚度为 6 μm)和 H. E. 染色,使用显微镜(OLYMPUS DP72,200×)进行镜检和拍照。将同一尾幼鱼使用两个方法鉴定生理性别的结果进行比较,以验证活体压片方法鉴定幼鱼性别的准确性。

2 结果

供性别鉴定的大菱鲆幼鱼体重分布以及各体重组中肉眼观察法、活体压片法和组织切片法鉴定性别的幼鱼比例分别见图 1 和图 2。

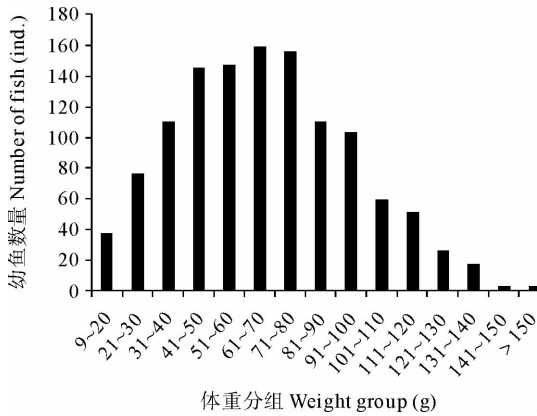


图 1 鉴定性别大菱鲆幼鱼体重分布

Fig. 1 Weight distribution of turbot young fish for sex identification (n=1 217)

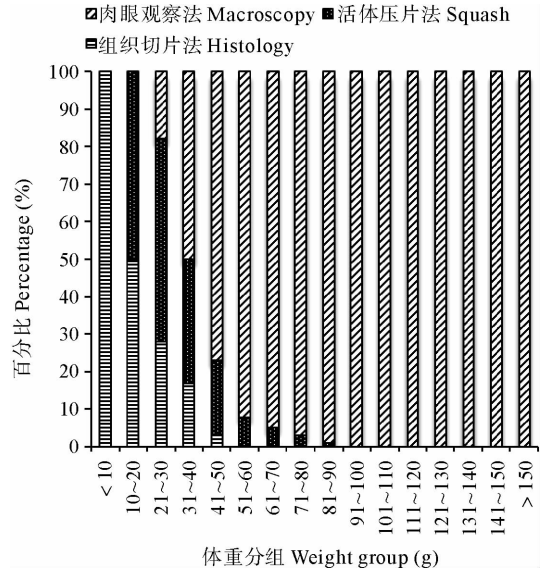
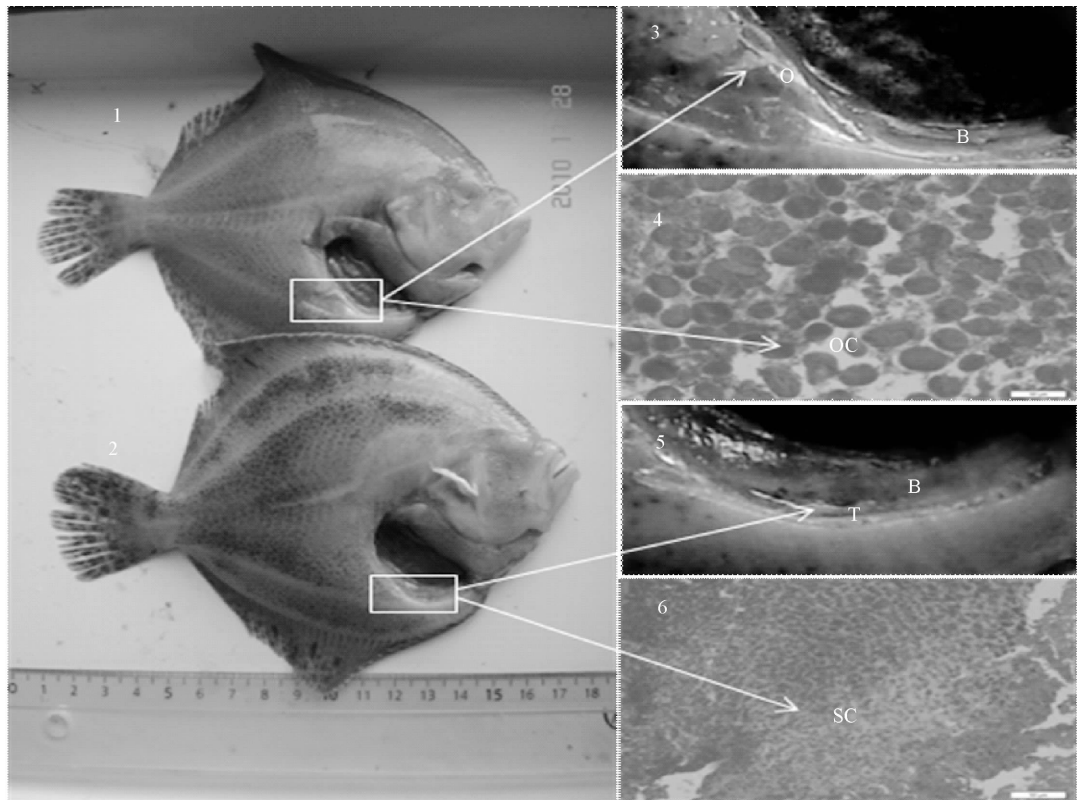


图 2 各体重组中肉眼观察法、活体压片法和组织切片法鉴定性别的大菱鲆幼鱼比例

Fig. 2 Percentages of young turbot sexed by macroscopic examination, wet squash and histological preparation in each weight group

体重>90 g 的 269 尾幼鱼中,有 143 尾雌鱼卵巢已经形成,呈三角形,位于膀胱后部,靠近外侧体壁,其中一角已经开始向假体腔中延伸(图版 I-3-O),126 尾雄鱼精巢呈线条状,位于膀胱和体壁之间(图版 I-5-T);性腺活体压片显示,卵巢中布满大小不一的较大卵母细胞颗粒(图版 I-4-OC),精巢中密布大小均一的细小精母细胞颗粒(图版 I-6-SC);对抽样的雌、雄各 5 尾幼鱼进行活体压片检查,采用肉眼观察与活体压片性别鉴定结果相一致。体重 10~90 g 的幼鱼中,790 尾性腺外部特征与体重>90 g 幼鱼的一样明显,另外 154 尾性腺外部特征不明显,均呈透明细线状,但是可以借助活体压片法区分出卵巢和精巢(图版 II);无外部明显特征同一个卵巢的组织切片和活体压片,显微观察表明,卵母细胞的图像非常完整且清晰可辨(图版 II-1、2),其活体压片特征与外部特征明显的卵巢一致(图版 II-2、图版 I-4);无明显外部特征同一个精巢的精母细胞,在组织切片中被规格较大的包裹所包被(图版 II-3),而经过活体压片处理时包裹破碎,释放出来的精母细胞特征与有明显外部特征精巢的活体压片相似(图版 I-6、图版 II-4)。对 58 尾体重 10~90 g 幼鱼同时运用了组织切片和活体压片两种方法进行性别鉴定,结果表明,其中雌鱼 33 尾,雄鱼 25 尾,没有发现间性幼鱼,并且两种性别鉴定方法结果完全一致。体重<10 g 的 4 尾幼鱼,生殖腺很小,解剖后肉眼几乎无法辨认,无法顺利剥离并进行醋酸洋红染色,只能通过全鱼固定和组织切片的方法鉴定雌雄。



1. 雌鱼;2. 雄鱼;3. 卵巢放大;4. 同一卵巢活体压片-醋酸洋红染色;5. 精巢放大;6. 同一精巢压片-醋酸洋红染色;

B: 膀胱;O: 卵巢;OC: 卵母细胞;T: 精巢;SC: 精母细胞;图版 I-1、4 标尺均为 50 μm

1. Female; 2. Male; 3. Enlargement of the ovary; 4. Same ovarian tissue stained with aceto-carmine; 5. Enlargement of the testis;

6. Same testicular tissue stained with aceto-carmine; B; Bladder; O: Ovary; OC: Oocyte;

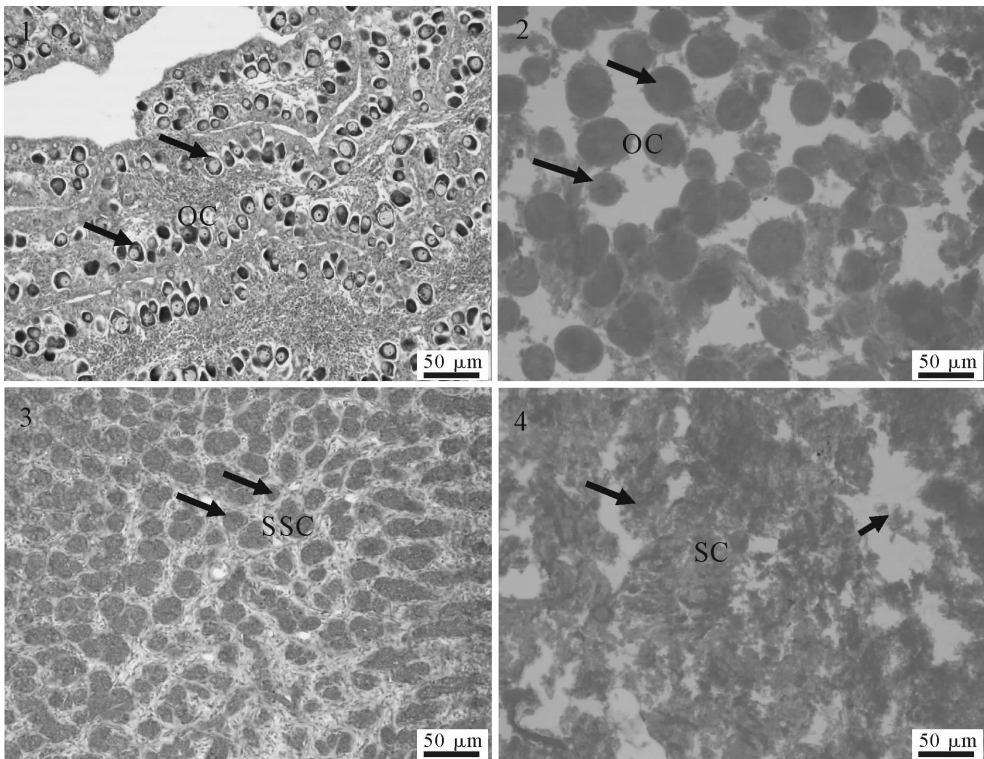
SG: Spermatocyte; T: Testis; Plate I-1 and 4 Scale bars = 50 μm

图版 I 大菱鲂幼鱼卵巢、精巢的解剖肉眼观察和活体压片-醋酸洋红染色特征

Plate I Macroscopic examinations and wet squash preparations of the ovary and testis of turbot young fish

3 讨论

稚幼鱼生理性别鉴定技术是探索鱼类性别决定机制的重要研究手段之一,目前已建立的技术主要包括肉眼观察体外性别特征(Wassermann *et al.* 2002)、体内性腺特征(Haffray *et al.* 2009; Haugen *et al.* 2011; Wassermann *et al.* 2002)、性腺超声波显微图像(Maeva *et al.* 2004)、显微观察性腺组织切片(马学坤等 2006)、活体压片(Guerrero *et al.* 1974; Menu *et al.* 2005)以及分析血液生理指标(Feist *et al.* 2004)等多种方法。上述方法中,体外性别特征分辨法最直接和快速简单,但是不能应用于像大菱鲂这种不具备体外两性特征差异的鱼类。其他如超声波图像观察和血液生理指标分析等方法,适用于在不杀死试验鱼的情况下对较大规格幼鱼进行性别鉴定,不仅需要昂贵的仪器设备和复杂的操作程序,而且精度较差,容易产生人为误差。在允许杀死试验鱼的情况下,性腺组织切片方法是最经典和准确的方法,适用于体重<10 g的大菱鲂幼鱼,但是需要专用仪器设备和复杂的操作程序,只适合处理少量样品和对其他性别鉴定方法进行验证,需要处理大量样品的时候解剖观察性腺形态特征较为可行;性腺形态观察法最简单和方便实用,缺点是要获得较为准确的精度,被鉴定的大菱鲂幼鱼体重需超过90 g。常规养殖条件下,从孵化后开始大菱鲂幼鱼体重量达到10 g和90 g分别需要90 d和180 d左右的时间,采用性腺活体压片方法,可以准确鉴定体重>10 g的大菱鲂幼鱼性别,而且可以在保证精度的情况下,缩短试验幼鱼养殖周期近一半。另外,目前大菱鲂苗种的销售规格一般为体重5~10 g,很少超过20 g,对于选择全雌苗种的养殖户,采用解剖观察性腺形态特征的方法鉴定



1、2 分别为同一卵巢的组织切片-H. E. 染色和活体压片-醋酸洋红染色;

3、4 分别为同一精巢的组织切片-H. E. 染色和活体压片-醋酸洋红染色;

OO: 卵母细胞; SSC: 精原细胞包裹; SC: 精母细胞; 比例尺 50 μ m

1 and 2 histological section and wet squash preparation of the same ovary, respectively;

3 and 4 histological section and wet squash preparation of the same testis, respectively;

OC: Oocyte; SC: Spermatocyte; SSC: Sac of spermatocyte; Scale bars = 50 μ m

图版 II 肉眼无法辨别的大菱鲆幼鱼卵巢和精巢的组织切片-H. E. 染色和活体压片-醋酸洋红染色特征
Plate II Coupled histological sections and wet squash preparations of turbot ovary and testis un-differentiable by macroscopic examination

苗种性别显然不适合。

总之,本研究所验证的性腺活体压片-醋酸洋红染色性别鉴定技术,特别适合于性腺特征不明显的体重 10~90 g 大菱鲆幼鱼性别的快速鉴定,不仅可以方便大菱鲆全雌苗种繁育技术的研究,而且可以为养殖户鉴定和选择全雌苗种提供一种快速、简便的性别鉴定方法。

参 考 文 献

- 马学坤, 柳学周, 温海深, 徐永江, 张立敬. 2006. 半滑舌鲷性腺分化的组织学观察. 海洋水产研究, 27(2): 55~61
- 田永胜, 陈松林, 邵长伟, 刘本伟, 庄志猛. 2008. 鲈鱼冷冻精子诱导半滑舌鲷胚胎发育. 海洋水产研究, 29(2): 1~9
- 刘海金, 王常安, 朱晓琛, 刘永新, 张晓彦, 侯吉伦, 唐楠. 2008. 牙鲆单倍体、三倍体、雌核发育二倍体和普通二倍体胚胎发育的比较. 大连水产学院学报, 23(3): 161~167
- 李忠红, 刘海金, 张世奎, 姜秀凤, 王玉芬. 2009. 雌核发育与正常二倍体条纹星鲷胚胎发育比较研究. 水产科学, 28(12): 752~756
- 孟振, 雷霖霖, 刘新富, 张和森. 2010. 不同倍性大菱鲆胚胎发育的比较研究. 中国海洋大学学报, 40(7): 36~42
- 雷霖霖. 2003. 大菱鲆养殖技术. 上海: 上海科学技术出版社
- 雷霖霖. 2005. 海水鱼类养殖理论与技术. 北京: 中国农业出版社, 524~591
- Arslan, T., and Phelps, R. P. 2004. Production of monosex male black crappie, *Pomoxis nigromaculatus*, populations by multiple androgen immersion. Aquaculture, 234(1-4): 561~573

- Cal, R. M., Vidal, S., Martínez, P., Álvarez-Blázquez, B., Gómez, C., and Piferrer, F. 2006. Growth and gonadal development of gynogenetic diploid *Scophthalmus maximus*. J. Fish Biol. 68(2): 401~413
- Feist, G., Van Eenennaam, J. P., Doroshov, S. I., Schreck, C. B., Schneider, R. P., and Fitzpatrick, M. S. 2004. Early identification of sex in cultured white sturgeon, *Acipenser transmontanus*, using plasma steroid levels. Aquaculture, 232(1-4): 581~590
- Gao, Z. X., Wang, H. P., Wallat, G., Yao, H., Rapp, D., O'Bryant, P., MacDonald, R., and Wang, W. M. 2010. Effects of a nonsteroidal aromatase inhibitor on gonadal differentiation of bluegill sunfish *Lepomis macrochirus*. Aquac. Res. 41(9): 1 282~1 289
- Guerrero, R. D., and Shelton, W. L. 1974. An aceto-carmin squash method of sexing juvenile fishes. Progressive Fish-Culturist, 36(1): 56
- Haffray, P., Lebègue, E., Jeu, S., Guennoc, M., Guiguen, Y., Baroiller, J. F., and Fostier, A. 2009. Genetic determination and temperature effects on turbot *Scophthalmus maximus* sex differentiation; An investigation using steroid sex-inverted males and females. Aquaculture, 294(1-2): 30~36
- Haffray, P., Petit, V., Guiguen, Y., Quillet, E., Rault, P., and Fostier, A. 2009. Successful production of monosex female brook trout *Salvelinus fontinalis* using gynogenetic sex reversed males by a combination of methyltestosterone immersion and oral treatments. Aquaculture, 290(1-2): 47~52
- Haniffa, M. A., Sridhar, S., and Nagarajan, M. 2004. Hormonal manipulation of sex in stinging catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch). Curr. Sci. India, 86(7): 1 012~1 017
- Haugen, T., Andersson, E., Norberg, B., and Taranger, G. L. 2011. The production of hermaphrodites of Atlantic cod (*Gadus morhua*) by masculinization with orally administered 17- α -methyltestosterone, and subsequent production of all-female cod populations. Aquaculture, 311: 248~254
- Imsland, A. K., Folkvord, A., Grung, G. L., and Stefansson, S. O. 1997. Sexual dimorphism in growth and maturation of turbot, *Scophthalmus maximus* (Rafinesque, 1810). Aquac. Res. 28: 101~114
- Maeva, E., Bruno, I., Zielinski, B. S., Docker, M. F., Severin, F. M., and Maev, R. G. 2004. The use of pulse-echo acoustic microscopy to non-invasively determine the sex of living larval sea lampreys. J. Fish Biol. 65(1): 148~156
- Magerhans, A., and Hörstgen-Schwark, G. 2010. Selection experiments to alter the sex ratio in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by means of temperature treatment. Aquaculture, 306(1-4): 63~67
- Menu, B., Peruzzi, S., Vergnet, A., Vidal, M. O., and Chatain, B. 2005. A shortcut method for sexing juvenile European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. Aquac. Res. 36(1): 41~44
- Piferrer, F., Cal, R. M., Gómez, C., Álvarez-Blázquez, B., Castro, J., and Martínez, P. 2004. Induction of gynogenesis in the turbot (*Scophthalmus maximus*): Effects of UV irradiation on sperm motility, the Hertwig effect and viability during the first 6 months of age. Aquaculture, 238(1-4): 403~419
- Wang, H., Gao, Z., Beres, B., Ottobre, J., Wallat, G., Tiu, L., Rapp, D., O'Bryant, P., and Yao, H. 2008. Effects of estradiol-17 β on survival, growth performance, sex reversal and gonadal structure of bluegill sunfish *Lepomis macrochirus*. Aquaculture, 285(1-4): 216~223
- Wassermann, G. J., and Afonso, L. O. B. 2002. Validation of the aceto-carmin technique for evaluating phenotypic sex in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry. Ciencia Rural, Santa Maria. 32(1): 133~139