网络出版时间:2026-01-09 DOI:10.13207/j.jnwafu.2026.07.001

暗纹东方鲀伪雄鱼制备及其性逆转相关基因 *FOXH1* 的克隆和组织表达分析

臧雪纯[1,2],唐晓东[1,2],刘雨曦[1,2],赵诚[1,2],谢骏[1,2],刁统治[1,2],
褚鹏[1,2],尹绍武[1,2],王涛[1,2]

(1 南京师范大学 海洋科学与工程学院,江苏 南京 210023;
2 江苏省特色水产育种与绿色高效养殖技术工程研究中心,江苏 南京 210023)

[摘 要] 【目的】使用外源雄激素 17α-甲基睾酮(17α-MT)诱导性别发育关键期 5~150 日龄的暗纹东方鲀,制备伪雄鱼,并探究其性逆转相关基因 *FOXH1* 的组织表达特征。【方法】设置无激素处理的对照组(雌鱼,雄鱼)和 30,60 mg/kg 17α-MT 处理的试验组(伪雄鱼)。采用性别特异分子标记鉴定试验鱼遗传性别,通过性腺组织学判定其生理性别。统计增重率、特定生长率和性腺成熟系数,测定性成熟个体精子活力。利用 RACE 技术克隆暗纹东方鲀性逆转相关基因 *FOXH1* 全长,对其在不同幼鱼性腺和成鱼性腺、脑、肝脏、鳃、心脏和肾脏中的表达水平进行检测。【结果】30~150 日龄间,试验组鱼增重率和特定生长率显著低于对照组,可见 17α-MT 抑制了鱼体生长。90 和 150 日龄时,试验组鱼性腺成熟系数显著低于对照组,表明试验组鱼性腺发育受到抑制;试验组鱼体性腺均呈精巢形态,可观察到精原细胞和初级精母细胞。2 龄和 3 龄伪雄鱼精子活力均大于对照组(雄鱼),MT30 和 MT60 组伪雄鱼精子活力无显著差异。暗纹东方鲀 *FOXH1* 基因全长 2 823 bp,包含开放阅读框 1 533 bp,5′ UTR 519 bp,3′ UTR 771 bp,编码 510 个氨基酸。暗纹东方鲀 FOXH1 氨基酸序列与红鳍东方鲀同源性最高(99.41%)。进化分析表明,暗纹东方鲀 FOXH1 氨基酸序列与红鳍东方鲀进化关系最近,与菊黄东方鲀、金钱鱼进化关系较近。*FOXH1* 在暗纹东方鲀 7 种组织(精巢、卵巢、脑、肝脏、鳃、心脏和肾脏)中均有表达,在卵巢中的表达量显著高于其他组织,伪雄鱼性腺中 *FOXH1* 表达显著低于对照组($P<0.05$)。【结论】17α-MT 能够诱导暗纹东方鲀雄性化,使其性腺精巢化发育并具有生理功能,但幼鱼生长受到一定的抑制;*FOXH1* 基因 mRNA 在暗纹东方鲀伪雄鱼性腺中表达水平显著降低($P<0.05$),推测 *FOXH1* 在暗纹东方鲀性逆转方面发挥着重要作用。

[关键词] 暗纹东方鲀;17α-甲基睾酮;伪雄鱼;性腺发育;*FOXH1* 基因
[中图分类号] S965.255.2+1 [文献标志码] A [文章编号] 1671-9387(2026)07-0001-10

Induction of pseudo-males and cloning and tissue expression analysis of sex reversal related gene *FOXH1* in pufferfish (*Takifugu fasciatus*)

ZANG Xuechun[1,2], TANG Xiaodong[1,2], LIU Yuxi[1,2], ZHAO Cheng[1,2], XIE Jun[1,2],
DIAO Tongzhi[1,2], CHU Peng[1,2], YIN Shaowu[1,2], WANG Tao[1,2]

(1 *College of Marine Science and Engineering, Nanjing Normal University, Nanjing, Jiangsu* 210023, *China*; 2 *Engineering Research Center for Aquatic Animals Breeding and Green Efficient Aquacultural Technology, Nanjing, Jiangsu* 210023, *China*)

Abstract: 【Objective】 This study aimed to induce sex differentiation during the critical developmental pe-

[收稿日期] 2025-06-05 [修回日期] 2025-08-01
[基金项目] 江苏省农业科技自主创新资金项目(CX(22)2029);江苏省种业振兴"揭榜挂帅"项目(JBGS[2021]034);江苏省第六期"333人才"培养支持项目
[作者简介] 臧雪纯(1999—),女,江苏连云港人,在读硕士,主要从事鱼类遗传育种研究。E-mail:xuechunzang@163.com
[通信作者] 王涛(1989—),男,江苏扬州人,副教授,博士,硕士生导师,主要从事鱼类遗传育种研究。E-mail:seawater88@126.com

riod (5－150 days of age) of *Takifugu fasciatus* using exogenous androgen 17α-methyltestosterone (17α-MT) to produce pseudo-male fish, and investigate the expression of the sex-reversal-related gene *FOXH*1.【Method】A control group (females and males without hormone treatment) and experimental groups treated with 17α-MT at 30 and 60 mg/kg (pseudo-males) were established. The genetic sex of experimental fish was identified using sex-specific molecular markers, and their physiological sex was determined by gonadal histology. Weight gain rate, specific growth rate, and gonadosomatic index (GSI) were calculated, and sperm motility was measured in sexually mature individuals. The full-length *FOXH*1 gene of *T. fasciatus* was cloned using RACE technology, and its expression levels were examined in the gonad of juvenile fish and the gonad, brain, liver, gill, heart and kidney of adult fish.【Result】From 30 to 150 days of age, the experimental groups exhibited significantly lower weight gain and specific growth rates compared with the control, indicating growth inhibition by 17α-MT. At 90 and 150 days of age, GSIs in the experimental groups were significantly lower than those of the control, suggesting suppressed gonadal development. Histological analysis showed that gonads of the treated fish developed into testes with observable spermatogonia and primary spermatocytes. In two-and three-year-old pseudo-males, sperm motility was higher than that of control males, with no significant difference between MT30 and MT60 groups. The full-length *FOXH1* cDNA of *T. fasciatus* was 2 823 bp, including a 1 533 bp open reading frame, a 519 bp 5′UTR, and a 771 bp 3′UTR, encoding 510 amino acids. The *FOXH*1 amino acid sequence of *T. fasciatus* shared the highest homology with *T. rubripes* (99.41%). Phylogenetic analysis revealed that the *FOXH*1 was most closely related to that of *T. rubripes*, and showed closer relationships to *T. flavidus* and *Monodactylus argenteus*. *FOXH*1 was expressed in all seven tested tissues (testis, ovary, brain, liver, gill, heart, and kidney), with significantly higher expression in the ovary. Its expression in the gonads of pseudo-males was significantly lower than that in the control group ($P<0.05$).【Conclusion】17α-MT can induce masculinization in *T. fasciatus*, leading to testicular development with functional spermatogenesis, although juvenile growth is suppressed. The significant downregulation of *FOXH*1 mRNA in the gonads of pseudo-males ($P<0.05$) suggests that *FOXH*1 plays an important role in sex reversal in *T. fasciatus*.

Key words: *Takifugu fasciatus*; 17α-Methyltestosterone; pseudo-male; gonadogenesis; *FOXH*1 gene

性别决定是最基本的生物学过程之一,脊椎动物启动雌雄发育的方式具有多样性和可变性[1]。在硬骨鱼中,性别决定是一个可塑的过程,由遗传因素和环境因素相互作用决定[2]。外源性激素是影响鱼类性腺分化以及生理性别决定的一个重要环境因素[3]。雄性激素在性腺分化、精子发生以及第二性征发育等方面起着重要的作用[4]。17α-甲基睾酮(17α-methyltestosterone,17α-MT)作为水产养殖中常用的人工合成雄性激素,可通过饲料添加等方式进行养殖品种的单一性别诱导[5]。部分养殖鱼类具有明显的性别二态性[6]。在养殖生产中,对于具有雌性性别优势且性别决定模式为XX-XY的经济鱼类,在其幼鱼性别发育的关键期进行激素处理可实现雄性化发育诱导,使其性逆转产生伪雄鱼,以伪雄鱼作为父本可生产全雌种群后代,从而为水产养殖品种的人工良种繁育提供稳定优质的雌性亲本来源[7]。刘娅等[8]利用含5 mg/kg 17α-MT的日粮及其他条件对12～65日龄的黄颡鱼幼鱼进行联合处理,并将性成熟的XX伪雄鱼与正常XX雌鱼进行人工繁殖,开展了全雌黄颡鱼的规模化繁殖与苗种培育工作。

暗纹东方鲀(*Takifugu fasciatus*)又称河鲀,属鲀形目、鲀科、东方鲀属,主要分布在我国近海(东海、黄海和渤海)和长江中下游地区,其肉质鲜美,与鲥鱼、刀鱼并称为“长江三鲜”,具有极高的经济价值[9]。根据2024中国渔业统计年鉴,2023年河鲀养殖总产量已达26 982 t,在福建、广东、江苏、河北、辽宁、山东和上海均有养殖。暗纹东方鲀作为我国重要的名特优水产养殖品种,其人工繁育长期使用的亲本出现种质资源衰退问题,这极大地限制了暗纹东方鲀新品种的选育和规模化繁育,制约其养殖产业的可持续发展。暗纹东方鲀是具有性别二态性的养殖鱼类,雌性个体生长更快,具有更优良的经济性状[10]。目前,已证实暗纹东方鲀的性别分化会受到温度和外源激素的影响[11-12]。在红鳍东方鲀养殖中,雌二醇(estradiol,E2)可诱导其雌性化,而17α-MT、

甲巯咪唑（methiamazole，MET）和米非司酮（mifepristone，RU486）可诱导其雄性化[13-15]。暗纹东方鲀是与红鳍东方鲀一样具有XX/XY性别决定系统的近缘物种，抗缪勒管激素受体Ⅱ型（anti-mullerian hormone receptor type 2，AMHR2）基因是性别决定的主效基因，可以此开发性别特异分子标记[9,16]。因此，暗纹东方鲀是进行性腺分化和性别遗传及发育探索的理想试验对象，对其进行性别决定研究具有理论意义和应用价值。

FOXH1（forkhead box subfamily H，member 1，FOXH1）属于高度保守的叉头框（FOX）转录因子家族，是生物体胚胎发育过程中重要的先锋转录因子，能够与特定的DNA靶序列（GG/GT）结合[17]。作为转录因子，FOX家族在生物体的性腺发育及性别分化中发挥着重要作用[18]。FOXH1为SMAD的伴侣蛋白，在TGF-β信号通路（transforming growth factor-β，TGF-β）转导中作为下游效应分子，调控卵细胞发育，并在卵巢组织中高度表达[19]。*FOXH1*基因已被证明在尼罗罗非鱼[20]、黄鳍棘鲷[21]和条石鲷[22]等物种的性腺发育过程中发挥着重要作用。然而，目前尚缺乏针对*FOXH1*在河鲀中的相关研究。为此，本研究采用17α-MT对5～150日龄暗纹东方鲀幼鱼进行雄性化诱导，获得遗传性别XX的伪雄鱼，比较试验组和对照组的生长指标、性腺发育及性成熟个体精子活力，并利用RACE技术获得暗纹东方鲀*FOXH1*全长，探究*FOXH1*在暗纹东方鲀性别转化中的表达特征，旨在为暗纹东方鲀全雌种群的繁育及性逆转调控机制研究提供基础资料。

1　材料与方法

1.1　材　料

暗纹东方鲀受精卵购自江苏省南通市中洋集团股份有限公司。受精卵在500 L流水孵化桶中进行人工孵化，孵化密度控制在（1×10^5）～（2×10^5）粒/桶，孵化期间维持水温22～24 ℃，盐度4～5 g/L。暗纹东方鲀出膜后2～20日龄投喂丰年虫，21日龄开始投喂鳗鱼粉料，随后逐渐过渡为河鲀专用配合饲料（粗蛋白≥42%）。幼鱼前期饲养在1.5 m×0.8 m×0.8 m的玻璃缸中，体长达3 cm以上时，转移至直径1 m、高0.8 m圆柱形塑料桶中继续饲养，饲养密度为50尾/桶。150日龄后，转移至循环养殖池中饲养至性成熟。每日09:00和18:00进行投喂，投喂饲料量以30 min内摄食完为宜。养殖期间每日清理残余饵料和粪便，监控养殖环境条件，维持水温为（26±2）℃，溶氧（7.0±0.5）mg/L。

17α-MT（Dr. Ehrenstorfer，德国），MS-222（Sigma，美国），4%多聚甲醛（赛维尔，中国），RNA提取试剂盒（诺唯赞RC113-01，中国），NanoDrop分光光度计（ThermoScientific，美国），反转录试剂盒（TaKaRa RR037A，日本）。

1.2　试验设计

采用激素拌喂方式诱导暗纹东方鲀性逆转，17α-MT处理期为5～150日龄，150日龄后正常饲喂。试验设置对照组（control check，CK）及30和60 mg/kg 17α-MT试验组（分别记为MT30和MT60），每组设置3个重复，每个重复200尾暗纹东方鲀幼鱼。试验组进行17α-MT饲料拌喂诱导，饲料处理方法：使用体积分数99%乙醇配制20 g/L的17α-MT母液，纯水稀释后拌入丰年虫和鳗鱼料中（17α-MT含量分别为30和60 mg/kg），于阴凉通风处待酒精挥发后进行投喂。对照组饲料不添加17α-MT，使用体积分数99%乙醇溶液做相同处理。

1.3　样品采集与保存

在30，90和150日龄时，分别随机抽取对照组及MT30、MT60组60，30和30尾暗纹东方鲀幼鱼，使用120 mg/L的MS-222进行麻醉。对取样的试验鱼进行编号，用吸水纸吸干体表水分后，称量鱼体质量。并取90日龄和150日龄试验鱼，剖取性腺组织，称其质量（精确到0.01 g），观察性腺外观。剪取性腺中部组织，置于含40 g/L多聚甲醛的离心管中，标记对应编号并于－4 ℃避光保存。同时，取对应试验鱼尾鳍和剩余性腺组织，经液氮速冻后于－80 ℃保存。此外，随机抽取2龄对照组雌鱼和雄鱼各3尾，剖取心脏、肝脏、脑、肾脏、鳃和性腺组织，置于RNA Store保存液中，在－20 ℃下保存待用。每组10个生物学重复。

根据鱼体质量和性腺质量，计算30～90，90～150和30～150日龄试验鱼增重率（weight gain rate，WGR）、特定生长率（specific growth rate，SGR）和性腺成熟系数（gonadosomatic index，GSI）。

$$WGR=(W_2-W_1)/W_1\times100\%; \quad (1)$$

$$SGR=(\ln W_2-\ln W_1)/t\times100\%; \quad (2)$$

$$GSI=(W_G/W)\times100\%。 \quad (3)$$

式中：W_1和W_2分别为开始和结束时暗纹东方鲀的平均体质量（g），t为间隔时间（d），W_G表示性腺质量

(g),W为鱼体质量(g)。

1.4 试验鱼遗传性别鉴定

取试验鱼尾鳍组织,使用商业试剂盒(Bioteke,DP1901)提取暗纹东方鲀基因组DNA,利用本试验室开发的暗纹东方鲀性别特异性分子标记,对暗纹东方鲀*AMHR2*基因进行PCR扩增。PCR反应体系包含2×SYBR Green Premix Ex *Taq* 10 μL、上游引物(10 μmol/L) 0.4 μL、下游引物(10 μmol/L) 0.4 μL、基因组DNA 50 ng,使用无菌且无核酸酶水补足至20 μL。扩增反应于实时荧光定量PCR仪(CFX96 Touch,Bio-Rad,USA)上完成,反应程序为:95 ℃预变性5 min;95 ℃变性15 s,60 ℃退火20 s,72 ℃延伸20 s,35个循环;72 ℃延伸5 min。扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳分离,根据凝胶上特定条带数量(2条条带为雌鱼,1条条带为雄鱼)进行遗传性别鉴定。

1.5 性腺组织学分析

将40 g/L多聚甲醛中固定24 h的性腺组织进行乙醇梯度脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,制备切片,控制切片厚度为5~6 μm。切片用苏木精-伊红(H.E)染色法进行染色,中性树胶封片,显微镜下观察组织结构和细胞形态,判断性腺发育状态,鉴定个体表型性别。综合组织学分析和分子标记鉴定结果,可判断试验鱼的生理和遗传性别,确定17α-MT处理后伪雄鱼的诱导情况,从而鉴定编号样本属于雌鱼(XX♀)、雄鱼(XY♂)或17α-MT处理获得的伪雄鱼(XX♂)。

1.6 精子活力测定

试验鱼性成熟后,采集2龄(体质量≥350 g/尾)和3龄(体质量≥450 g/尾)亲本规格的暗纹东方鲀伪雄鱼(MT30、MT60)和普通雄鱼(XY)的精液,检测其精子活力。每组随机抽取5尾,经人工催产后,挤腹法采集新鲜精液。吸取微量精液于载玻片中央,滴加等量纯水均匀混合以激活,采用CASA(computer-assisted sperm analysis,CASA)系统对精子活力进行检测。

1.7 *FOXH1*基因全长克隆与生物信息学分析

采用RNA提取试剂盒提取2龄暗纹东方鲀性腺、脑、肝脏、鳃、心脏和肾脏组织总RNA,1%琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性,NanoDrop分光光度计测量RNA样品的纯度和浓度。总RNA样品质检合格后使用反转录试剂盒合成cDNA第一链。根据暗纹东方鲀基因组中*FOXH1*的开放阅读框(open reading frame,ORF),使用Primer Premie 5.0软件设计*FOXH1*扩增引物FOXH1-F1和FOXH1-R1(表1),以cDNA第一链为模板,对*FOXH1*基因ORF进行PCR扩增。将扩增产物进行1%琼脂糖凝胶电泳,对目的条带进行切胶回收。将回收产物连接至T3载体,转化到DH5α感受态细胞,涂布至平板培养基进行过夜培养,挑取单克隆送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

表1 试验用引物

Table 1 Primer sequences used in the study

引物名称 Primer name	引物序列(5′→3′) Sequence of primer (5′→3′)	用途 Purpose
FOXH1-F1	ATGACAAAACACTGTCCG	*FOXH1*基因ORF扩增 Amplification of *FOXH1* ORF
FOXH1-R1	GGCTGGCACAGACACTCGC	
FOXH1-F2	CTCCGAATCTGTGCGTTCATCTCC	RT-qPCR
FOXH1-R2	CCTGTCCGTGCGAGTCAAGTTG	
β-actin-F	CAGGGAGAAGATGACCCAGA	内参基因*β-actin*扩增 Amplification of house-keeping gene *β-actin*
β-actin-R	CATCACCAGAGTCCATGACG	
FOXH1-5′ RACE	GAGGGACCATTTGGGC ATGGACGGACTCTGCTGC GTGGGACAGGGAGGGTAATA	5′-UTR片段扩增 Amplification of 5′-UTR
FOXH1-3′ RACE	AAATGCGGTCGCTCCACCTAGTAT TATGGCAGCTCTCCAGTGGCACCC AAATGCGGTCGCTCCACCTAGTAT	3′-UTR片段扩增 Amplification of 3′-UTR

根据ORF片段的测序结果,使用Primer Premie 5.0软件设计*FOXH1*的5′-UTR特异性引物FOXH1-5′RACE和3′-UTR特异性引物FOXH1-3′RACE(表1),使用SMART™ RACE cDNA Amplification Kit试剂盒分别进行*FOXH1*基因5′-UTR和3′-UTR序列的扩增。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳分离,切胶回收后连接至T3载体,转化至DH5α感受态细胞,筛选阳性克隆并送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。测得的ORF、5′-UTR与3′-UTR片段序列经拼接后获得

*FOXH1*基因全长cDNA序列。

对所获得的*FOXH1* cDNA序列及其推导的氨基酸序列使用NCBI BLAST（https://blast.ncbi.nlm.nih.gov）进行同源性检索。使用Jellyfish软件（version 4.1.1.0）分析序列总长。使用DNAMAN（version 8.0.8.789）确定基因ORF。使用ExPASy Translate（https://web.expasy.org/translate/）将ORF序列翻译为氨基酸，使用ExPASy-ProParam（http://www.expasy.org/tools/protparam.html）预测*FOXH1*基因编码蛋白的理论分子质量、等电点。使用ClustalX2进行氨基酸序列多重比对，与GenBank数据库中其他物种的氨基酸进行比较。使用MEGA 11软件基于邻接法（Neighbor-Joining）构建系统发育树。

1.8　*FOXH1*基因的表达分析

以*β-actin*为内参基因（引物序列见表1），采用实时荧光定量PCR（real-time quantitative PCR，RT-qPCR）技术检测90和150日龄暗纹东方鲀雌鱼、雄鱼和伪雄鱼性腺中*FOXH1*基因的表达水平（引物FOXH1-F2和FOXH1-R2序列见表1），以及2龄暗纹东方鲀雌、雄个体中*FOXH1*基因的组织（性腺、脑、肝脏、鳃、心脏和肾脏）表达情况。反应体系（20 μL）：Super Mix 10 μL，cDNA 2 μL，FOXH1-F2、FOXH1-R2各0.4 μL，ddH_2O 7.2 μL。反应在实时荧光定量PCR仪（LightCycler®96，Roche）上进行，反应程序为：94 ℃预变性30 s；94 ℃变性5 s，60 ℃退火30 s，45个循环。每个样品设置3个生物学重复，并进行3次技术重复。反应结束后分析熔解曲线，确认引物特异性，采用$2^{-\triangle\triangle Ct}$法计算基因表达量。

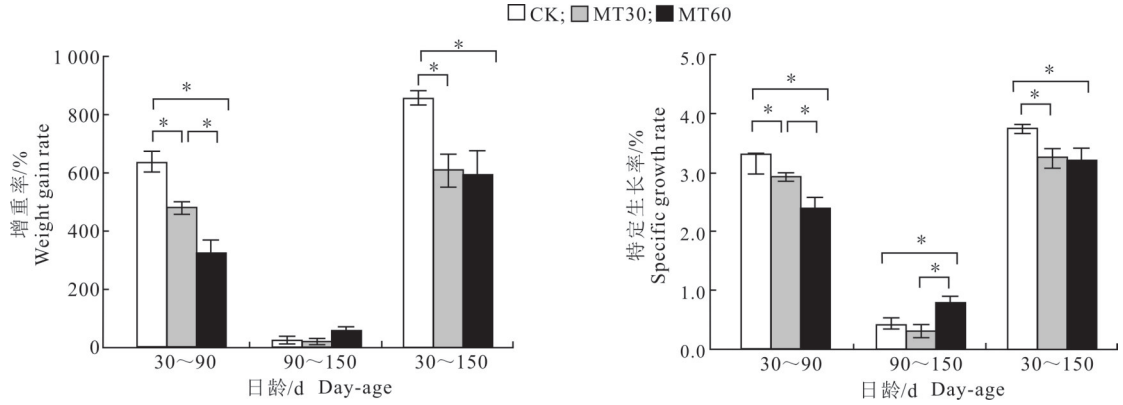
1.9　数据处理

试验数据以“平均值±标准差”表示。使用SPSS 27.0软件对数据进行单因素方差分析和Tukey检验。

2　结果与分析

2.1　17α-MT对暗纹东方鲀WGR和SGR的影响

暗纹东方鲀伪雄鱼WGR和SGR的测定结果如图1所示。由图1可知，在17α-MT处理前期（30～90日龄），各组增重率和特定生长率大小排序均为CK＞MT30＞MT60，且各组间差异显著（$P<0.05$），MT60较MT30进一步降低；处理后期（90～150日龄），组间增重率在统计学上无显著差异（$P>0.05$），特定生长率从高到低为MT60＞CK＞MT30，与CK相比，MT60增重率和特定生长率有所上升；在整个试验处理期间（30～150日龄），对照组增重率和特定生长率均显著高于试验组，MT30和MT60组间无显著差异（$P<0.05$）。



*表示差异显著（$P<0.05$）。图6同。

* indicates significant difference（$P<0.05$）. The same as in Fig. 6.

图1　暗纹东方鲀伪雄鱼增重率和特定生长率比较

Fig. 1　Comparison of WGR and SGR of *T. fasciatus*

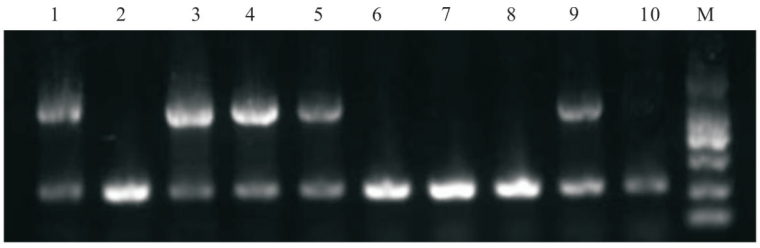
2.2　暗纹东方鲀遗传性别鉴定

如图2所示，经特异性分子标记鉴定，2条条带的样本为遗传雌性（XX），1条条带的样本为遗传雄性（XY）。

2.3　17α-MT对暗纹东方鲀性腺发育的影响

暗纹东方鲀幼鱼性腺大小表现雌鱼＞雄鱼＞MT30组伪雄鱼＞MT60组伪雄鱼（图3）。雌鱼卵巢发育良好，呈中间宽两端窄的饱满椭圆形结构，外观为粉红色（图3-A），卵细胞发育至初级卵母细胞，可观察到粉红色细胞核结构（图4-A、E）；雄鱼性腺小于雌鱼，颜色较深，呈长杆形（图3-B），可观察到精原细胞和初级精母细胞，细胞核为深蓝色（图

4-B、F);伪雄鱼性腺发育(图 3-C、D)明显小于对照组,为不饱满的棕色平扁条状,性腺组织学(图 4-C、D、G、H)与雄鱼性腺发育结构相似,呈现出精巢的形态特征。

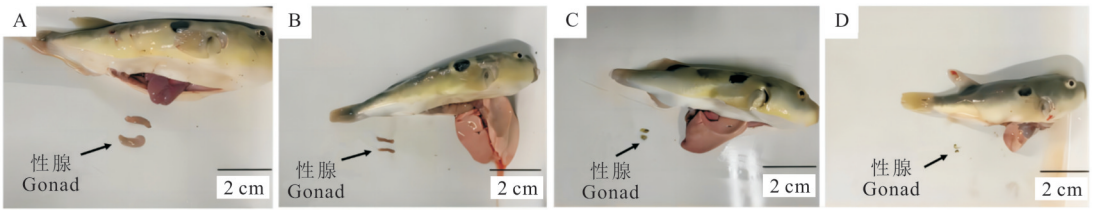


1,3~5,9. 遗传雌性(XX);2,6~8,10. 遗传雄性(XY);M. DL2000 DNA Marker。

1,3—5,9. Genetic female (XX);2,6—8,10. Genetic male (XY);M. DL2000 DNA Marker.

图 2 暗纹东方鲀遗传性别鉴定

Fig. 2 Genetic sex identification of *T. fasciatus*

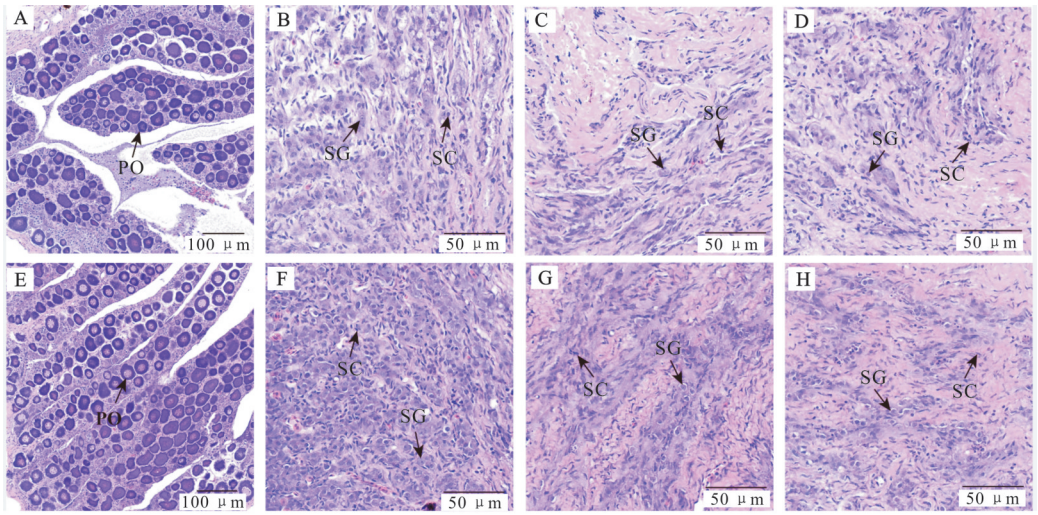


A. 雌鱼;B. 雄鱼;C. MT30组伪雄鱼;D. MT60组伪雄鱼。

A. Female;B. Male;C. Pseudo-male in MT30 group;D. Pseudo-male in MT60 group.

图 3 17α-MT 诱导下 150 日龄暗纹东方鲀性腺外观比较

Fig. 3 Comparison of the gonadal appearance of 150-day-old *T. fasciatus* induced by 17α-MT



A. 90 日龄雌鱼;B. 90 日龄雄鱼;C. 90 日龄 MT30 组伪雄鱼;D. 90 日龄 MT60 组伪雄鱼;E. 150 日龄雌鱼;F. 150 日龄雄鱼;G. 150 日龄 MT30 组伪雄鱼;H. 150 日龄 MT60 组伪雄鱼。PO. 初级卵母细胞;SG. 精原细胞;SC. 初级精母细胞。

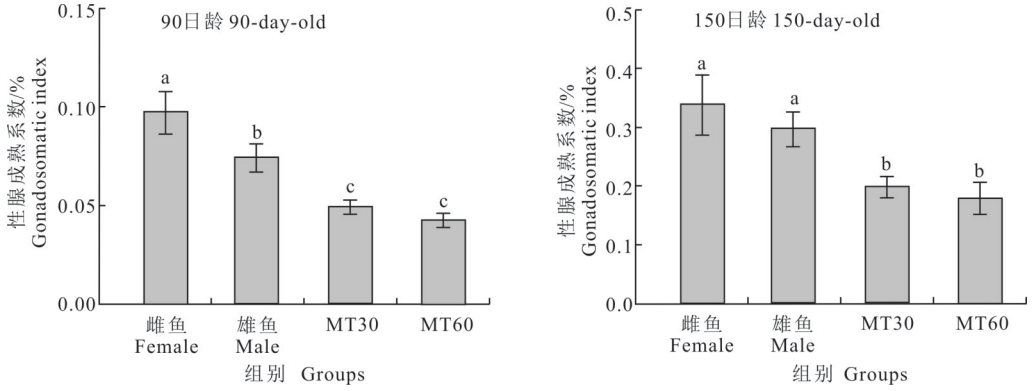
A. 90-day-old female; B. 90-day-old male;C. 90-day-old MT30 group pseudo-male;D. 90-day-old MT60 group pseudo-male; E. 150-day-old female;F. 150-day-old male;G. 150-day-old MT30 group pseudo-male;H. 150-day-old MT60 group pseudo-male. PO. Primary oocyte;SG. Spermatogonia;SC. Primary spermatocyte.

图 4 17α-MT 对暗纹东方鲀性腺发育的影响

Fig. 4 Effects of 17α-MT on gonad development of *T. fasciatus*

试验鱼性腺成熟系数计算结果(图 5)显示,在 90 和 150 日龄各组鱼性腺成熟系数均呈现出雌鱼>雄鱼>MT30 组伪雄鱼>MT60 组伪雄鱼的变化规律,MT30 和 MT60 组伪雄鱼性腺成熟系数无显著差异($P>0.05$),但均显著低于雌鱼和雄鱼。在 90 日龄时,雌鱼性腺成熟系数显著高于雄鱼($P<0.05$)。在 150 日龄时,各组鱼性腺成熟系数均高于 90 日龄;雄鱼的性腺成熟系数与雌鱼差异不显著

（$P>0.05$）。



图柱上标不同小写字母表示组间差异显著（$P<0.05$）。图9同。

Different lowercase letters above bars indicate significant differences ($P<0.05$). The same as in Fig. 9.

图5　17α-MT对90和150日龄暗纹东方鲀性腺成熟系数的影响

Fig. 5　Effects of 17α-MT on gonadosomatic index of 90- and 150-day-old *T. fasciatus*

2.4　性成熟伪雄鱼和雄鱼精子活力比较

如图6所示，性成熟后，2龄试验组伪雄鱼精子活力均大于85%，显著高于雄鱼对照组（$P<0.05$）；3龄MT30和MT60组伪雄鱼的精子活力略高于雄鱼对照组，但无显著差异。

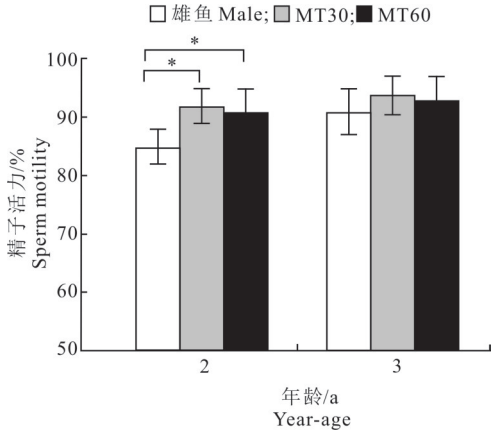


图6　暗纹东方鲀雄鱼和伪雄鱼精子活力对比

Fig. 6　Comparison of sperm motility of male and pseudo-male *T. fasciatus*

2.5　暗纹东方鲀*FOXH1*基因的克隆及序列分析

克隆得到暗纹东方鲀*FOXH1*基因的cDNA全长序列为2 823 bp，其ORF长1 533 bp，5′ UTR长519 bp，3′ UTR长771 bp，编码510个氨基酸（图7）。*FOXH1*基因编码蛋白的理论分子质量为56.11 ku，理论等电点为9.06，蛋白质平均疏水系数为−0.722，表明其为亲水性蛋白。*FOXH1*基因位于暗纹东方鲀6号染色体上，其编码蛋白的第128～206位氨基酸残基为保守的FH结构域。

多序列比对分析结果显示，暗纹东方鲀FOXH1氨基酸序列与红鳍东方鲀FOXH1氨基酸序列的同源性最高（99.41%），与其他物种同源性分别为金钱鱼78.27%，条纹锯鲨75.58%，欧洲黄盖鲽74.71%，欧洲鳎71.40%，多鳞白甲鱼55.79%，鲫51.47%，智人54.69%，非洲爪蟾42.30%，条纹斑竹鲨31.50%。

FOXH1系统进化树分析结果（图8）显示，暗纹东方鲀与红鳍东方鲀聚为一支，与菊黄东方鲀并列，同属于鲀形目；金钱鱼与条纹锯鲨聚为一支，属于鲈形目；欧洲黄盖鲽与欧洲鳎聚为一支，属于鲽形目；以上7种鱼FOXH1的进化关系较近。鲤形目的多鳞白甲鱼与鲫聚为一支，哺乳纲的智人与两栖纲的非洲爪蟾聚为一支。软骨鱼纲的条纹斑竹鲨与其他动物的FOXH1进化关系较远。

2.6　暗纹东方鲀*FOXH1*基因的表达分析

比较暗纹东方鲀伪雄鱼和对照组（雌鱼和雄鱼）性腺*FOXH1* mRNA表达水平，结果（图9）显示，表达量从高到低表现为雌鱼＞雄鱼＞MT30组伪雄鱼＞MT60组伪雄鱼，暗纹东方鲀卵巢中*FOXH1*表达量显著高于精巢和17α-MT处理后的伪雄鱼性腺（$P<0.05$），MT30和MT60组伪雄鱼*FOXH1* mRNA表达水平相近。

图10表明，雌鱼*FOXH1*在卵巢中表达量最高，显著高于其他组织（$P<0.05$），各组织表达量从高到低依次为：性腺（卵巢）＞肝脏＞肾脏＞心脏＞脑＞鳃；雄鱼各组织*FOXH1*的表达量均低于雌鱼对应组织，表达量从高到低依次为：肝脏＞肾脏＞性腺（精巢）＞心脏＞脑＞鳃。



起始密码子和终止密码子为蓝色字体。红色框内为FH结构域。

The start codon and the stop codon are in blue. The red box indicates the FH domain.

图 7 暗纹东方鲀 *FOXH1* 基因的核酸与氨基酸序列

Fig. 7 Nucleotide and amino acid sequences of *FOXH1* of *T. fasciatus*

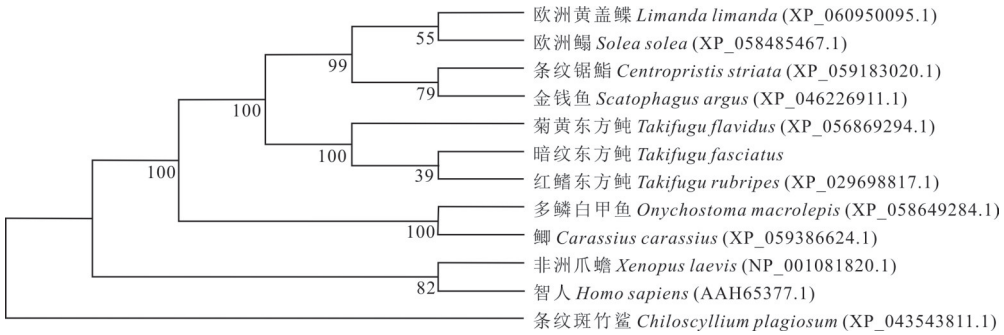
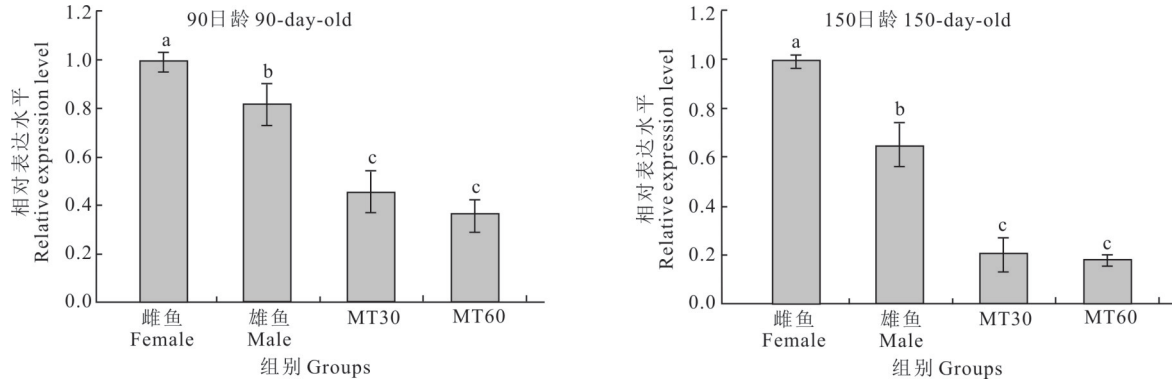


图 8 暗纹东方鲀 FOXH1 系统进化分析

Fig. 8 Phylogenetic analysis of the FOXH1 gene in *T. fasciatus*

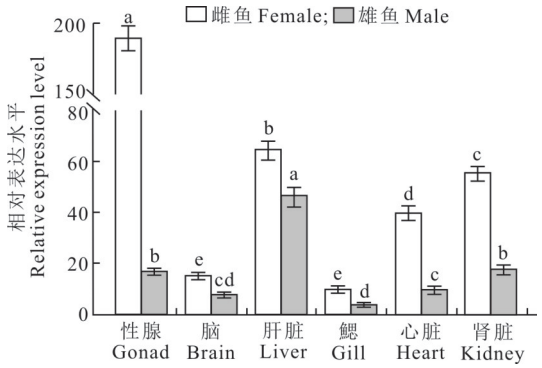


以雌鱼表达量为基准进行相对表达分析。

Relative expression levels are calculated using the female group as the calibrator.

图 9 90和150日龄暗纹东方鲀性腺中 *FOXH1* 基因的表达量

Fig. 9 Expression levels of the *FOXH1* gene in the gonads of 90- and 150-day-old *T. fasciatus*



以雄鱼鳃组织的表达水平为基准进行相对表达分析。图柱上标不同小写字母表示同一性别不同组织间差异显著（$P<0.05$）。
Relative expression levels were calculated using the gill tissue of the male group as the calibrator. For each sex, different lowercase letters above bars indicate statistically significant differences among tissues ($P<0.05$).

图 10　2 龄暗纹东方鲀*FOXH1*基因的组织表达分析
Fig. 10　Tissue expression analysis of *FOXH1* in 2-year-old *T. fasciatus*

3　讨　论

3.1　17α-MT 对暗纹东方鲀的雄性化诱导作用

暗纹东方鲀是我国重要的淡水养殖鱼类，其性别分化具有可塑性[11]。出膜后早期是东方鲀属鱼类性别分化的关键时期，易受外源激素的影响[23]。17α-MT是人工诱导鱼类性逆转常用的激素药物[7]。研究表明，在发育关键期选择适宜浓度的17α-MT和处理方式对鱼进行诱导可有效控制鱼的性别。例如，在罗非鱼幼鱼饲料中添加 60 mg/kg 的17α-MT，第12天开始可在形态学水平观察到性别分化，所有处理个体在第25天后均发生性逆转[24]；以激素浸泡法对14日龄的雌性罗非鱼进行雄性化诱导，1 mg/L浓度诱导6 h后可获得95.33%的雄性率[25]。对卵形鲳鲹幼鱼（30～60日龄）进行200 μg/kg 17α-MT拌喂处理30 d，转录组分析发现17α-MT主要通过影响性腺组织中多胺的合成以及诱导卵母细胞凋亡来诱导卵巢向精巢转化[26]。

因此，本研究在暗纹东方鲀性别分化的关键期（5～150日龄），用2种浓度17α-MT（30，60 mg/kg）拌喂处理XX遗传型个体，经遗传性别和性腺组织学鉴定成功得到了雄性化发育个体，性腺组织可见精原细胞和初级精母细胞。但激素处理抑制了鱼体的生长发育，处理期间增重率、特定生长率和性腺成熟系数显著低于对照组，这与前人对翘嘴鲌[27]的研究结论一致。组织学和精子活力统计显示，MT30和MT60组均能产生具有成熟精子的伪雄鱼成体。因此，17α-MT拌喂（30～60 mg/kg）能有效诱导5日龄的雌性暗纹东方鲀转为生理雄性，伪雄鱼具有雄性特征并能够产生活力正常的精子。依据本研究方案培育的暗纹东方鲀性成熟伪雄鱼可作为全雌种群繁育的父本，对实现稳定优质亲本供给及良种繁育具有参考意义。

3.2　暗纹东方鲀性逆转相关基因*FOXH1*的表达分析

FOX蛋白家族是典型的转录因子，参与胚胎发育、细胞周期调控和性别分化等重要生物学过程[18]。FOXH1作为FOX家族的关键转录因子之一，能单独或协同调控靶基因表达[19]。FOXH1和SMAD为伴侣蛋白，互作域高度保守，共同参与TGF-β信号通路转导[20]。研究表明，SMAD/FOXH1介导的TGF-β信号通过调控*cyp*19*a*1*a*影响黄鳝卵巢发育和生殖，FOXH1与SMAD4协同起转录抑制作用[28]。TAO等[20]发现，尼罗罗非鱼*FOXH1*$^{-/-}$XX敲除体在180日龄卵子发育停滞，GSI显著降低；*FOXH1*$^{-/-}$斑马鱼胚胎中出现明显的中线发育异常[29]。这表明*FOXH1*对鱼类雌性性别分化和早期胚胎发育至关重要。

本研究基于课题组已有的暗纹东方鲀基因组数据，克隆了暗纹东方鲀*FOXH1* cDNA全长序列，探究其在17α-MT诱导的暗纹东方鲀伪雄鱼中的表达。暗纹东方鲀*FOXH1* cDNA全长2 823 bp，包含1 533 bp编码区，预测编码510个氨基酸。暗纹东方鲀FOXH1与红鳍东方鲀FOXH1的序列相似性最高（99.41%），且在进化树中聚为一支，符合近缘物种的高同源性。*FOXH1*在鱼类中表现出母系表达特征[29-30]。对黄鳍棘鲷的精巢和卵巢进行转录组分析结果显示，*FOXH1*作为卵泡发育关键基因在卵巢中的表达量显著高于精巢[21]。有学者对条石鲷的性别二态性基因进行表达鉴定，发现*FOXH1*在卵巢中的表达水平显著高于精巢（$P<0.05$）[22]。本研究在mRNA水平检测*FOXH1*在暗纹东方鲀伪雄鱼性腺及性成熟个体中的组织表达特征，结果显示，*FOXH1*在供试的7种组织中均有不同水平表达，雌性各组织的表达水平均高于雄性，且在卵巢中高度表达。本研究采用17α-MT对出膜5～150日龄暗纹东方鲀进行处理，成功诱导产生伪雄鱼。17α-MT抑制了雌性遗传性别发育并导致*FOXH1*基因显著下调（$P<0.05$），推测*FOXH1*在17α-MT诱导的性逆转中具有重要作用，但其具体作用机制

有待进一步研究。

[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] 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.

[3] YANN G, FOSTIER A, PIFERRER F, et al. Ovarian aromatase and estrogens: a pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish[J]. General and Comparative Endocrinology, 2010, 165(3): 352-366.

[4] LIU S Z, CHEN Y, LI T Y, et al. Effects of 17α-methyltestosterone on the transcriptome and sex hormones in the brain of *Gobiocypris rarus*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(4): 3571.

[5] LANTE S, ROSMIATI R, PARENRENGI A, et al. Methyltestosterone 17α-injection as a safe alternative way to enhance maturation and immune response of tiger shrimp *Penaeus monodon* transgenic F1[J]. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2024, 1410(7): 012016.

[6] 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.

[7] HWANG J A, PARK J S, JEONG H S, et al. Influence of 17α-methyltestosterone on morphological deformities and pigmentation development in juvenile Japanese eels, *Anguilla japonica*[J]. Animals, 2024, 14(18): 2684.

[8] 刘娅,于跃,鲁子怡,等. 黄颡鱼XX伪雄鱼诱导与全雌种群规模化繁育[J]. 水生生物学报, 2022, 46(12): 1939-1948.
LIU Y, YU Y, LU Z Y, et al. Introduction of XX pseudomales, and large-scale reproduction of all-female population in yellow catfish[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2022, 46(12): 1939-1948.

[9] ZHAO C, CHU P, Liu Y X, et al. Review on the reproductive biology of the *Takifugu* genus and its application in sex control[J]. Aquaculture, 2024, 579: 740241.

[10] 毕宜慧,张鑫宇,李杰,等. 暗纹东方鲀雌雄个体形态差异及其判别分析[J]. 海洋渔业, 2021, 43(5): 563-572.
BI Y H, ZHANG X Y, LI J, et al. Analysis of morphological index and discrimination of male and female *Takifugu fasciatus*[J]. Marine Fisheries, 2021, 43(5): 563-572.

[11] 黄波,杨小玉,戴奇,等. 芳香化酶抑制剂对暗纹东方鲀*CYP*19*A*、*DMRT*1基因表达及性腺分化的影响[J]. 中国水产科学, 2013, 20(1): 68-74.
HUANG B, YANG X Y, DAI Q, et al. Effect of aromatase inhibitor on expression of *CYP*19*A*, *DMRT*1, and gonadal sex differentiation in *Takifugu obscures*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(1): 68-74.

[12] 张玉晴,高诗朦,张鸿业,等. 双酚A对暗纹东方鲀幼鱼类固醇合成酶基因表达的影响[J]. 中国水产科学, 2015, 22(2): 250-258.
ZHANG Y Q, GAO S M, ZHANG H Y, et al. Bisphenol A modulates expression of sex steroid synthetase genes in *Takifugu obscurus* juveniles[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2015, 22(2): 250-258.

[13] YUAN Z, SHEN X F, YAN H W, et al. Effects of the thyroid endocrine system on gonadal sex ratios and sex-related gene expression in the pufferfish *Takifugu rubripes*[J]. Frontiers in Endocrinology, 2021, 12: 674954.

[14] YAN H W, SHEN X F, JIANG J M, et al. Gene expression of *Takifugu rubripes* gonads during AI- or MT-induced masculinization and E2-induced feminization[J]. Endocrinology, 2021, 162(10): 1-20.

[15] GAO R, YAN H W, ZHOU H T, et al. Administration of mifepristone can induce masculinization and alter the expression of sex-related genes in *Takifugu rubripes*[J]. Aquaculture Reports, 2024, 36: 102172.

[16] DUAN W, GAO F X, CHEN Z W, et al. A sex-linked SNP mutation in *amhr2* is responsible for male differentiation in obscure puffer (*Takifugu obscurus*)[J]. Molecular Biology Reports, 2021, 48: 6035-6046.

[17] TAKAHASHI K, TANABE K, OHNUKI M, et al. Induction of pluripotency in human somatic cells via a transient state resembling primitive streak-like mesendoderm[J]. Nature Communication, 2014, 5: 3678.

[18] WU S Y, ZHANG Y, LI Y J, et al. Identification and expression profiles of Fox transcription factors in the Yesso scallop (*Patinopecten yessoensis*)[J]. Gene, 2020, 733: 144387.

[19] HOWELL M, INMAN G J, HILL C S. A novel *Xenopus* Smad-interacting forkhead transcription factor (XFast-3) cooperates with XFast-1 in regulating gastrulation movements[J]. Development, 2002, 129(12): 2823.

[20] TAO W J, SHI H J, YANG J, et al. Homozygous mutation of *foxh*1 arrests oogenesis causing infertility in female Nile tilapia[J]. Biology of Reproduction, 2019, 102(3): 758-769.

[21] LI S, LIN G. Gonadal transcriptome analysis of sex-related genes in the Protandrous Yellowfin Seabream (*Acanthopagrus latus*)[J]. Frontiers in Genetics, 2020, 11: 709.

[22] LI H, ZHU Q. Identification and characterization of dimorphic expression of sex-related genes in Rock Bream, a fish with multiple sex chromosomes[J]. Frontiers in Genetics, 2021, 12: 791179.

[23] 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.

[24] CAMPOS S R, COELHO D M, SANTOS C A, et al. Sexual differentiation and sex reversal in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by hormone 17α-methyltestosterone similar to that used in cultivation systems[J]. Aquaculture, 2023, 574(15): 739624.

(下转第19页)