

DOI: 10.12264/JFSC2023-0277

十足目甲壳动物性别控制与单性养殖研究进展

陈仕海^{1,4}, 靳雅琦², 张子平³, 王艺磊¹

1. 集美大学水产学院, 海水养殖生物育种全国重点实验室, 福建 厦门 361021;
2. 福建农林大学动物科学学院, 福建 福州 350002;
3. 福建农林大学海洋学院, 福建省海洋生物技术重点实验室, 福建 福州 350002;
4. 广东渔泽原生物科技有限公司, 广东 珠海 519000

摘要: 十足目甲壳动物性别决定与分化途径有多种方式, 其中多数表现出雌雄二态性模式。本文综述了十足目甲壳动物性别决定和分化分子调控机制的研究进展, 总结了在其中发挥重要作用的眼柄、促雄腺等组织, 以及 *IAG* 和 *dmrt* 等关键基因的功能, 探讨通过激素诱导和 RNA 干扰技术等获得十足目甲壳动物单性群体的性别控制方案, 期为十足目甲壳动物性别控制深入研究和单性苗种养殖提供参考。

关键词: 甲壳动物; 性别控制; 单性养殖

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2024)01-0106-22

十足目甲壳动物种类丰富, 有复杂的生活史, 性别决定与分化途径也有多种方式。其中, 多数十足目水产经济动物表现出性别二态性生长模式或雌雄差异经济性状, 如罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)^[1]、日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)^[2]、凡纳对虾(*Penaeus vannamei*)^[3]、拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)^[4]、中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)^[5]、克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)^[6]、红螯光壳螯虾(*Cherax quadricarinatus*)^[7]等。对这些水产经济动物需求的持续增长, 推动了其苗种生产与养殖管理技术的不断进步。因此, 性别控制与单性(全雄或全雌)苗种培育及其养殖技术研究, 在遗传育种和养殖经济效益提高等方面具有重要意义^[8-9], 成为十足目水产经济动物的研究热点之一^[10-23]。

在十足目甲壳动物的性别控制中, 已有三倍体诱导、外源激素或化学物质处理、促雄腺(Andr-

ogenic gland, AG)摘除和移植, 以及胰岛素样促雄腺激素(insulin-like androgenic gland hormone, IAG)基因的 RNA 干扰技术等多种方法来建立高度单性化群体的研究报道。这些方法在性别决定与分化的调控机制研究方面具有重要的应用价值。本文综述了十足目甲壳动物性别决定和性别分化的分子调控机制研究进展, 阐述在这一过程中发挥作用的关键因素, 如眼柄、促雄腺等内分泌组织器官, *IAG* 基因和 *dmrt* [*Doublesex and male abnormal-3 (mab-3) related transcription factor*] 基因家族等关键基因, 探讨 RNA 干扰技术等获得单性群体的性别控制方案, 期为十足目甲壳动物规模化单性苗种生产和养殖研究提供参考和理论依据。

1 十足目甲壳动物性别决定与性别分化机制

性别决定和性别分化是动物性别形成的两个

收稿日期: 2023-10-24; 修订日期: 2023-12-18.

基金项目: 国家自然科学基金项目(41676161, 31472266); 国家重点研发计划项目(2018YFD0900205); 福建省海洋经济发展专项(FJHJF-L-2022-18).

作者简介: 陈仕海(1990-), 男, 博士研究生, 工程师, 研究方向为水产动物遗传育种. E-mail: 1799068823@qq.com

通信作者: 王艺磊, 博士, 教授, 研究方向为水产动物遗传与生殖生理. E-mail: ylwang@jmu.edu.cn

主要过程,性别分化则是在性别决定的影响下开始的表型变化。与脊椎动物相比,影响甲壳动物性别决定和分化过程的因素复杂多样,性别的遗传决定差异很大。

十足目甲壳动物的性别决定和性别分化历经多次演变,其分子机制涉及性染色体、性别决定与性别分化的关键因子、表观遗传学修饰以及基因表达调控网络等多个层面。其中的关键基因可能包括 *tra-2*、*sxl*、*fem-1*、*fruitless*、*masc*、*sox* 基因家族、*dmrt* 基因家族、*IAG*、*CFSH* 和 *foxl2* 等。这些复杂的机制使得十足目甲壳动物在发育早期或特定生长阶段实现性别的决定和分化,从而适应不同的自然环境条件。

1.1 性别决定与性别分化

1.1.1 性别决定 十足目甲壳动物的性别具有较大的可塑性,表现出多样的性别决定模式和生殖策略,其中雌雄异体(gonochorism)是最为常见的。大多数情况下雌雄异体的雌雄个体在性别分化后分别保持各自雌性或雄性性别特征。但也有较为复杂的雌雄异体情况,例如,罗氏沼虾存在 3 种雄性形态^[24],表明其不同的生殖行为和第二性征;红螯光壳螯虾有较为普遍的雌雄间性现象(intersexuality 或 intersexual phenotype)^[25-26],反映其性别可塑性程度高。而更为复杂的生殖策略是雌雄同体(hermaphroditism),它分为同时性的(simultaneous hermaphroditism)或顺序性的(sequential hermaphroditism)。同时性雌雄同体指个体可同时为功能性雄性和雌性,如藻虾科鞭藻虾属的锯齿鞭腕虾(*Lysmata debelius*)、安波鞭腕虾(*Lysmata amboinensis*)等^[27]。顺序性雌雄同体指在生活史中能改变其性功能的个体,分为雄性先熟雌雄同体(protandry)和雌性先熟雌雄同体(protogyny),存在一个短暂的雌雄间性过渡阶段。两性在功能上是分开的,形态上也有所不同,但个体在不同生活史阶段分别产生雄性和雌性配子。例如,宽角长额虾(*Pandalus platyceros*)是一种雄性先熟的雌雄同体虾类,其生活史表现为 3 个连续的生命阶段,即从功能性雄性,经历过渡阶段,最后转变为功能性雌性^[28]。而另一种极端的生殖策略是孤

雌生殖(parthenogenesis),大理石纹螯虾[龙纹螯虾(*Procambarus fallax*)三倍体变异种]通过“无性生殖”策略,即不需要受精就能产生可存活的后代,从而形成一个全雌性的群体^[29]。虽然关于性别决定的演化尚缺乏直接证据,但根据现有的研究,认为甲壳动物性别决定最初是以雌雄同体(包括顺序性雌雄同体和同时性雌雄同体)的形式出现,环境型性别决定(environment sex determination, ESD)可能是从顺序性雌雄同体在早期胚胎发育阶段性别转换时的异时性转变进化而来,雌雄同体和 ESD 都有发展为雌雄异体遗传型性别决定(genetic sex determination, GSD)的潜力,但很少有从 GSD 转化为 ESD 的情况^[23]。

甲壳动物的性别决定从多基因控制,到具有优势性别决定因素和常染色体控制,再到具有雄性异配子或雌性异配子的高度进化性染色体。在雄性和雌性中,性别决定系统分别使用不同的基因和调节机制,从而来控制性别分化和性腺发育的关键调节基因^[30]。雌雄异体动物遗传性别决定的生理过程起始于受精卵形成,由配子贡献的性染色体决定了性别,最终导致性别分化和性成熟。十足目甲壳动物中,同属的物种也可能会采用不同的性别决定模式,包括 XX/XY 型和 ZZ/ZW 型等。由于十足目甲壳动物的染色体具有数量多、形态较小等特征,从形态上来辨别性染色体较为困难。根据已研究物种的测交实验和子代性别统计,以及越来越多的分子生物实验证据表明,多数十足目甲壳动物为 ZZ/ZW 型性别决定模式,但部分蟹类和龙虾中也存在 XX/XY 性别决定等模式^[8,10]。

十足目甲壳动物的性别决定与分化是一个复杂的过程,涉及基因之间以及基因与环境之间的相互作用网络。由于其原始的性别决定系统具有性别可塑性,在一定程度上也受到光照、盐度、温度和激素等环境因素的影响。

1.1.2 性别分化 经过性别决定过程后,紧接着是性别分化阶段,这一阶段受到不同激素调节的影响。在脊椎动物中,精巢产生睾酮(17 α -methyltestosterone, MT)等激素,而卵巢产生雌激素和孕酮等,这些激素的作用是维持两性的发育。在

生命周期的关键阶段,性激素的相对丰度对两性的正常发育非常重要。而在十足目甲壳动物中,调控性别分化的确切机制尚未被阐明。甲壳动物雌性性激素(crustacean female sex hormone, CFSH)和胰岛素样促雄腺激素(IAG)被认为可能是十足目甲壳动物性别分化的两个主要调控因子。CFSH 是甲壳动物特有的一种神经激素,存在两个不同的亚型,首次在蓝蟹(*Callinectes sapidus*)中发现^[31],在甲壳动物性别分化中有重要作用,参与雌性的性别分化和第二性征维持^[32-34]。

与雌性不同,在雄性十足目甲壳动物研究中,普遍认为促雄腺分泌的 IAG 是雄性性别分化的关键调节因子^[20],如雄性性腺分化、第二性征的发育与雄性行为的维持等。在雄性十足目甲壳动物中, *CFSH*、*sxl*、*sox* 基因家族、*dmrt* 基因家族、*foxl2*、*fem-1* 等可能在“眼柄-促雄腺-精巢”内分泌轴上对 *IAG* 的调控起重要作用^[19]。通过这些性别分化相关基因的差异表达,可能直接或间接地调控促雄腺的发育,调节雄性化发育过程。而眼柄中分泌的甲壳动物高血糖激素(crustacean hyperglycemic hormone, CHH)、性腺抑制激素(gonad-inhibiting hormone, GIH)和蜕皮抑制激素(molt inhibiting hormone, MIH)等多种神经激素可能负向调节 *IAG* 的表达,参与“眼柄-促雄腺-精巢”内分泌轴的调节。其中 GIH 是甲壳动物繁殖最有效的负调节因子,由于其抑制卵子发生和卵黄蛋白原(vitellogenin, VTG)合成的功能而为人熟知,因此,GIH 又被称为卵黄生成抑制激素(vitellogenesis inhibiting hormone, VIH)^[35]。拟穴青蟹中,发现并验证了 *vih* 基因上游调控区域 OCT4/SOX9 两个转录因子的结合位点,并证明了它们对 *VIH* 的正向调控作用^[36-38]。通过将 *Oct4* 或 *Sox9* 的 dsRNA 注射到眼柄对其进行干扰后,检测到 *vih* 的表达显著下调,而 *vtg* 在卵巢和肝胰腺中的表达则显著上调^[37]。

甲壳动物中类固醇激素主要分为蜕皮类固醇激素和性类固醇激素^[39]。在多种甲壳动物的血淋巴、大颚器、卵巢和肝胰腺中均检测到脊椎动物样性类固醇激素,如 17 β -雌二醇(17 β -estradiol,

E2)、孕酮和睾酮等,但其来源目前尚不完全清楚,相关理论有待进一步验证^[40]。E2 参与调控生长、生殖和代谢过程,尚不清楚其调控甲壳动物卵巢发育的分子机制,对雌性甲壳动物的性别相关基因调控机制和相互作用知之甚少。脊椎动物雌激素是通过与雌激素受体(estrogen receptor, ER)结合来行使其功能。目前尚未见 *ER* 同源基因在甲壳动物中的报道,但发现一种与脊椎动物 *ER* 具有高度序列同源性的雌激素相关受体(estrogen related receptor, ERR)。*ERR* 是基于与 *ER α* 结合域序列具有高度相似性,采用低严谨杂交技术进行 cDNA 文库筛选所发现的,无脊椎动物中仅发现一种 *ERR* 基因,目前已在拟穴青蟹^[41]、三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)^[42]、罗氏沼虾^[43]等十足目甲壳动物中报道。

另外,在十足目甲壳动物的中枢神经系统中发现了神经递质如 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、多巴胺(dopamine, DA)^[44-45],以及神经激素如黑化诱导神经肽(corazonin)、促性腺激素释放激素(gonadotropin releasing hormone, GnRH)等^[46-47]。有研究报道,5-HT 和 DA 可能影响十足目甲壳动物神经激素的释放,如 CHH、GIH、GSH (gonad-stimulating hormone)和 MIH^[48]。Ohs 等^[49]报道了 DA 添加到罗氏沼虾日常投喂中,可以使其雌性化。Siangcham 等^[50]使用 5-HT 和 LGnRH-III 处理罗氏沼虾的雄性小虾(指雄虾 3 种形态中个体较小,性腺发育不成熟的小雄虾),观察到促雄腺增生和 *IAG* 表达上调。而 DA 和黑化诱导神经肽对罗氏沼虾的处理则得到相反的结果。以上研究表明,5-HT 和 DA 等可能通过抑制或刺激眼柄神经激素,调控 *IAG* 的表达,从而参与到性别分化过程中。

1.2 十足目甲壳动物的促雄腺

1.2.1 促雄腺的形态构造与位置 促雄腺是雄性甲壳动物所特有的内分泌腺,促雄腺分泌的激素对雄性分化、维持雄性第二性征以及生长调节起到调控作用^[18]。

促雄腺最早在蓝蟹中被发现^[51],十足目甲壳动物的促雄腺位置较为集中但存在略微差异。例

如, 红螯光壳螯虾和克氏原螯虾的促雄腺常附在输精管近末端的表面^[52-53]; 罗氏沼虾和日本沼虾的促雄腺则位于输精管末端至壶腹末端表面^[54-55]; 中华绒螯蟹和锯缘青蟹(*Scylla serrata*)的促雄腺则附于射精管的表面^[56-57]; 在凡纳对虾和墨吉对虾(*Penaeus merguensis*)中, 则位于精荚囊端壶腹外侧的肌肉中^[58-59]; 而在中国对虾(*Penaeus chinensis*)^[60]中则位于第五步足基部的肌肉中, 覆盖在精荚囊和射精管连接处。

促雄腺由许多腺状细胞组成, 细胞内粗面内质网、高尔基体和线粒体发达, 主要分为两种细胞: I 型细胞和 II 型细胞。I 型细胞是新形成的腺体细胞, 它们高密度地聚集在一起, 细胞体积小, 细胞核相对较大, 细胞质较少; II 型细胞占促雄腺细胞的大多数, 在分泌周期中活性最高, 相比于 I 型细胞, 它们有更大细胞尺寸, 更小的细胞核, 更多的细胞质^[61]。在腺状细胞周围, 由结缔组织连接腺体和周围所附生的生殖系统而形成血窦。邱高峰等^[56]将中华绒螯蟹促雄腺发育过程分为增殖、合成、分泌 3 种时期。叶海辉等^[57]将锯缘青蟹促雄腺发育划分为 I 期(腺体短小)、II 期(腺体呈明显索状)、III 期(腺体体积达到最大)、IV 期(腺体退化)。

1.2.2 促雄腺的功能 十足目甲壳动物中, 移植促雄腺或注射促雄腺提取物到雌性个体, 雌性外部特征退化, 卵黄生成受到抑制, 发生雌性向雄性的转变; 而摘除促雄腺的雄性个体则精巢发育减缓或退化, 产生雌性化特征^[21,62-64]。红螯光壳螯虾的研究表明, 促雄腺移植导致雌虾出现雄性第二性征以及雌性第二性征的退化^[65], 比普通雌虾更具好斗性, 展示雄性特有的求偶行为, 且与正常雌性有配对现象, 比普通雌性生长更快, 在 mRNA 水平和蛋白质水平卵黄生成均受到抑制^[66]。在其幼虾阶段, 移植促雄腺或饲喂促雄腺提取物, 使生长性能得到提升^[63,67]。Barki 等^[68]指出, 促雄腺对雄虾的行为有重要影响, 去除促雄腺会导致雌雄间性个体的行为向雌性方向发生改变。在罗氏沼虾中, 摘除促雄腺会导致雄性个体的雄性化程度降低, 同时雌性特征会得到发展; 如果在早

期生长发育阶段摘除促雄腺, 会导致雄虾发生性逆转, 转化为具有功能性的伪雌虾^[69]。例如, Aflalo 等^[62]在雄性罗氏沼虾性别分化阶段摘除促雄腺, 发生了性逆转获得功能性伪雌个体, 然后伪雌虾与正常雄性交配, 成功获得全雄子代。同样地, 若在早期发育阶段移植促雄腺到罗氏沼虾的遗传性别雌性个体, 则发生完全性逆转从而获得功能性伪雄虾^[70]。进一步地, Levy 等^[64]将罗氏沼虾促雄腺的细胞悬液注射到幼虾中, 导致其个体完全的性逆转, 发育为成熟雄性, 表现出典型的雄性形态。由此可知, 促雄腺是雄性性别分化的关键内分泌腺, 促雄腺组织细胞内含有雄性性别分化和性别特征维持的关键因子。在顺序性雌雄同体中的研究, 进一步地支持了促雄腺在性别分化中维持雄性特征和雄性化作用的功能。在该性别决定模式中, 个体在雄性阶段时, 促雄腺是高度活跃的, 在两性过渡阶段促雄腺开始退化, 并在雌性阶段完全消失^[71]。因此认为, 促雄腺控制了十足目甲壳动物雌雄异体和雌雄同体的雄性分化。

而促雄腺摘除时所处发育阶段是雌性化成功的重要因素之一。例如, 在罗氏沼虾中, 早期未分化阶段进行促雄腺摘除时, 显示出更高层次的雌性化; 然而, 在后期发育阶段进行促雄腺摘除时, 仅见部分雌性化甚至没有, 并检测到了许多异常性腺^[72-73]。Aflalo 等^[62]也指出, 在未分化阶段摘除促雄腺的雄性罗氏沼虾, 将会自分化为雌性。因此, 在进行促雄腺摘除和移植相关生物技术操作或 RNA 干扰诱导性别分化关键基因沉默时, 个体所处发育阶段对于性逆转成功非常重要。

1.2.3 “眼柄-促雄腺-精巢”内分泌轴 在十足目甲壳动物中, 内分泌通路“眼柄-促雄腺-精巢”调节个体性成熟^[52], 眼柄中的 X 器官-窦腺复合体(X-organ/sinus-gland complex, XO-SG)是其神经内分泌系统的中枢, 调节各种生理过程包括新陈代谢、蜕壳、生殖发育等。研究发现, 切除眼柄可诱导十足目甲壳动物加速性成熟, 并使得促雄腺细胞肥大和 *IAG* 基因过表达^[52,74-76]。切除雄性凡纳对虾的单侧眼柄后, *IAG* 基因的表达显著上调, 对比眼柄切除前后的精巢转录组数据发现多

个参与性腺发育和内分泌调控的基因表达显著上调, 如 *dsx* (*Doublesex*), 保幼激素环氧水解酶 (juvenile hormone epoxide hydrolase, *JHEH*) 基因、细胞色素 p450 酶系基因以及泛素化系统相关基因等^[77]。同样地, 在墨吉对虾 (*Penaeus merguensis*) 中, 切除其单侧眼柄引起 *IAG* 转录水平的显著上调^[76]。这些研究提示促雄腺及 *IAG* 的作用受到眼柄调节, 进而调控精巢相关基因的表达。而眼柄中 XO-SG 复合体分泌多种神经激素, 其主要成分包括两个 CHH 超家族: CHH 超家族 I 包括 CHH 和离子转运肽 (Ion transport peptide, ITP), CHH 超家族 II 包括 GIH、MIH 和大顎器官抑制激素 (mandibular organ-inhibiting hormone, MOIH)。

虽然 CHH 家族已经在许多十足目甲壳动物中进行了研究, 但它调控性别分化和性腺成熟的途径仍不是很清楚。最近的研究表明, 罗氏沼虾眼柄切除后, 检测到精巢和促雄腺中 *dsx* 的表达水平显著上调^[78], 以及 *IAG*、胰岛素样促雄腺激素受体 (insulin-like androgenic gland hormone receptor, IAGR) 基因、胰岛素样促雄腺激素受体结合蛋白 (insulin-like androgenic gland hormone-binding protein, IAGBP) 基因的表达显著上调^[79-80]。RNA 干扰引起 CHH 或 GIH 基因沉默后, 同样检测到 *IAG*、*IAGR*、*IAGBP* 的表达上调^[79-80]。Li 等^[81]通过 RNA 干扰, 检测了日本沼虾 GIH、MIH、CHH 和 *IAG* 之间的相互调控作用。结果表明, 与对照组相比, 分别注射 *GIH* dsRNA、*MIH* dsRNA 后, *IAG* 的表达量显著上调。说明由眼柄分泌的 CHH、GIH、MIH 等多种神经激素可能负向调控 *IAG* 的表达, 参与到“眼柄-促雄腺-精巢”内分泌轴调节, 从而调控性别分化。

1.3 *IAG* 基因的结构与功能

1.3.1 *IAG* 的结构性质 促雄腺激素 (AGH) 首次从鼠妇 (*Armadillidium vulgare*) 的促雄腺中纯化获得^[82], 其化学结构被确定为具有 N-连接聚糖部分的胰岛素样异二聚体肽。在十足目中, Manor 等^[83]利用抑制消减杂交 (suppression subtractive hybridization, SSH) 构建了红螯光壳螯虾促雄腺 cDNA 文库, 首次克隆得到 *IAG* 基因 (*Cq IAG*), 其序列

与等足目 *AGH* 相似性较低, 但氨基酸结构相似, 属于胰岛素样超级家族成员。*Cq IAG* 推测的氨基酸序列与 AGH 相比较, 在 A 链和 C 肽之间以及 B 链和 C 肽之间都有两个典型的蛋白水解基序 (R-X-X-R), 但在基序位置上存在差异, 该基因组织表达和原位杂交结果表明其在雄性壶腹末端特异性表达。随后, Ventura 等^[84]在罗氏沼虾 cDNA 文库中发现了 *IAG*, 与 *Cq IAG* 相比, 在结构上除了第 3 个链间二硫键存在差异外, 其他方面均表现出了高度的相似性, 特别是胰岛素家族中保守的 6 个半胱氨酸残基存在于所有 *IAG* 序列中, 目前已从许多十足目甲壳动物中克隆得到^[84-87], 这表明 *IAG* 介导的性别分化机制在十足目物种间是较保守的。因此, 普遍推测 *IAG* 对应的成熟多肽可能是十足目甲壳动物的 AGH。虽然有相关研究报道^[88], 但天然 *IAG* 尚未从十足目动物中完全分离纯化, 还没有关于 *IAG* 多肽功能的直接证据。目前已经通过化学合成或重组蛋白表达系统制备了 *IAG* 肽^[89-92]。结果表明, *IAG* 的肽构象受二硫键排列的影响。而且, 通过体外实验证实, 合成的 *IAG* 可抑制日本对虾 (*Penaeus japonicus*) 雌性特异性基因的表达^[92]; 东澳岩龙虾 (*Sagmariasus verreauxi*) 的重组 *IAG* 能提高其精巢中的蛋白质磷酸化作用和受体激活作用^[93]。Katayama 等^[89]合成的龙纹螯虾 *IAG* 具有胰岛素样型和鼠妇 AGH 型两种二硫键排列类型, 其 CD 光谱分析显示, B 链上的 Asn 连接的聚糖部分不影响肽的构象。在体实验结果表明, 这两种合成的 *IAG* 均能抑制其体内卵母细胞的成熟。

1.3.2 *IAG* 的功能 “眼柄-促雄腺-精巢”内分泌轴调节雄性十足目甲壳动物的性别分化和次级雄性特征。而 *IAG* 由促雄腺分泌, 是雄性甲壳动物的主要性别分化开关^[17]。在红螯光壳螯虾的雌雄间性个体中, *IAG* 基因沉默后, 精子产生减少, 精巢退化, *vtg* 表达上调, 并在发育中的卵母细胞中储存卵黄蛋白^[94]; 雄性墨吉对虾中, dsRNA 注射引起 *IAG* 基因沉默后, 检测到精巢和肝胰腺中 *vtg* 的表达^[75]。罗氏沼虾中, 雄虾的 3 种不同形态可能与 *IAG* 有关, 研究发现, 橘螯 (orange claw, OC)

雄虾的 *IAG* 表达增强, 可以使其向蓝螯(blue claw, BC)的转变数量显著增加^[95]。Ventura 等^[84]通过短期 RNA 干扰沉默 *IAG* 基因后, 罗氏沼虾雄性成体第二性征的再生受到抑制; *IAG* 沉默个体表现出非典型的雄性生长模式、精子发生和精原细胞发育停滞的生殖表型, 以及促雄腺肥大和增生。之后, Ventura 等^[96]又通过长期 RNA 干扰方法使雄性罗氏沼虾仔虾个体的 *IAG* 沉默, 成功性逆转获得伪雌个体, 与正常雄性交配, 成功获得全雄子代。

而 *IAG* 除了受到眼柄中的 CHH、GIH、MIH 等激素调控, 还受到上游多种转录因子的调控。在中国对虾中, *IAG* 启动子区域发现了一个可能的 Dsx 结合位点, *dsx* 敲降后, *IAG* 的表达显著下调, 这表明 Dsx 可能是 *IAG* 的上游调控因子^[97]。在拟穴青蟹中^[98], 对 *IAG* 基因的启动子区域进行预测发现了 Dsx 和 FOXL2 的结合位点, 细胞共转染实验结果表明, *dsx* 能显著促进 *IAG* 的表达, 而 *foxl2* 能显著抑制 *IAG* 的表达; 在体 RNA 干扰实验表明, 分别干扰 *dsx* 和 *foxl2* 后, *IAG* 的表达分别显著下调和上调。在三疣梭子蟹中, *sox9* 的敲降导致促雄腺和精巢中的 *IAG* 表达量显著下调^[99]; 脊尾白虾中, 切除眼柄导致 *sox9* 的表达显著下调, 而 *sox9* 敲降后, *IAG* 的表达显著下调^[100]。表明 *sox9* 可能在 *IAG* 的上游起正向调控作用, 且受到眼柄的负调控。在红螯光壳螯虾中, 由 RNA 干扰引起的 *fruitless-like* (果蝇 *fruitless* 同源基因) 基因沉默, 也使得 *IAG* 基因的表达显著下调^[101]。而在果蝇中, *fruitless* (*fru*) 是一种多效基因, 位于性别决定调节层级的下游, 控制着雄性的性行为, 被认为在黑腹果蝇的求偶行为和性别决定中具有重要作用^[102-103]。Liu 等^[104]对红条鞭腕虾(*Lysmata vittata*)的 *IAG1* 基因(*Lvit-IAG1*)研究发现, *Lvit-IAG1* 特异表达于促雄腺, 高表达于功能性雄性阶段, 并在真雌雄同体阶段显著降低。短期和长期沉默实验均表明, *Lvit-IAG1* 同时负调控眼柄神经节中的性腺抑制激素(*Lvit-GIH*)和甲壳类雌性性激素(*Lvit-CFSH*)的表达, 这提示 *IAG* 可能反馈调节 *GIH* 和 *CFSH*。在罗氏沼虾中^[105-106], *dmrt11E* 基因敲降导致 *IAG* 表达显著降低, 在雄性的仔虾

阶段, 通过 RNA 长期干扰注射 *dmrt11E* dsRNA, 诱导了雄虾完全的功能性性逆转, 并成功实现了全雄单性群体的产生。这表明罗氏沼虾 *dmrt11E* 可能在 *IAG* 基因上游发挥调控作用, 并通过直接或间接影响 *IAG* 的表达参与了性别分化调控。另一方面, *IAG* 基因沉默使罗氏沼虾两个 *dmrt* 基因即 *idmrt1b* 和 *idmrt1c* 的表达显著下调, 提示它们可能在 *IAG* 开关的下游参与性别分化调控^[107]。

此外, 研究结果表明, 一些 miRNA 通过对 *IAG* 的表达调控参与到性别分化过程。例如, miR-184 通过介导 *IAG* 的表达, 可能参与罗氏沼虾的性别分化、性腺发育、生长和蜕壳等生理过程^[108]。克氏原螯虾中, 通过 RNA 干扰 *IAG* 后比较雄性克氏原螯虾 mRNA/miRNA 的表达谱, 发现 *IAG* 基因沉默后, 卵巢发育相关基因表达量发生上调, 精巢发育相关基因表达量发生下调, 5 个性别相关的 miRNA (miR-263a、miR-263b、miR-2779、miR-133、miR-34) 表达发生显著变化且在性腺组织中高表达^[109]。

胰岛素样肽(insulin-like peptides, ILPs)在脊椎动物的生长、代谢和繁殖中起着关键作用, *IAG* 被认为是甲壳动物的一种 ILPs。然而, 关于参与 *IAG* 信号级联的关键因子的研究仍然很分散。在罗氏沼虾中, 胰岛素样受体基因(insulin-like receptor, *IR*)在雌雄的大多数组织(包括促雄腺和性腺)中均有表达; 幼虾的长期 RNA 干扰实验表明, *IR* 基因沉默对生长没有显著影响, 也没有引起性逆转, 但显著引起促雄腺肥大和 *IAG* 的表达上调^[110]。与上述研究结果稍有不同的是, Tan 等^[111]研究发现, 使用 siRNA 长期干扰的方法敲降罗氏沼虾 *IR*, 发生了性逆转获得伪雌个体, 并检测到 *dmrt11E*、*dmrt99B*、*MRPINK*、*Mrr*、*Sxl1* 和 *Sxl2* 的表达水平显著下调; 而且 *IR* 主要在精母细胞、促雄腺细胞和末端壶腹分泌上皮细胞中表达, *IR* 与 *IAG* 的共定位证实了 *IR* 为 *IAG* 的受体。而 *IAG* 信号通路可能通过胰岛素样肽与受体的结合而激活, 包括 *IAGR* 和 *IAGBP*。例如, 在罗氏沼虾^[112]与日本沼虾中^[110]敲降 *IAGBP*, 均导致 *IAG* 表达下调。而日本沼虾中 *IAG* 的敲降也显著降低了 *IAGBP* 的

基因已陆续在十足目甲壳动物中鉴定和研究报道。

1.4.1 *Dmrt* 基因家族 转录因子 *dmrt* 基因家族是一组编码含有 DM (doublesex and mab-3) 结构域的基因, DM 结构域是一个复杂的锌指状 DNA 结合元件^[117-118]。该基因家族参与多种生理过程, 特别是性别决定、性别分化和性腺发育, 在昆虫中发现的 *dsx* 是第一个鉴定的 *dmrt* 基因^[119]。该基因家族的 DM 结构域内的序列高度保守, 但在结构域之外有大量可变序列^[118]。DM 结构域的保守性使得人们能够识别与之结合的基因, 事实上, 在人类和果蝇中已经发现了许多与性别决定相关的基因, 但这类研究在甲壳类动物中还较少报道。

虽然 *dmrt* 基因不一定是性别决定主效基因, 但它们往往直接或间接地与主开关基因相互作用。因此, 鉴定 *dmrt* 基因将有助于十足目甲壳动物中性别决定位点的定位和机制研究。目前, 已在多种十足目甲壳动物中鉴定出 *dmrt* 基因家族成员, 如中华绒螯蟹^[120]、东澳岩龙虾^[121]、日本沼虾^[122]和罗氏沼虾^[106]等。本课题组基于转录组数据和 RNA 干扰实验等研究, 对拟穴青蟹 *dmrt* 基因家族 7 个基因(*dmrt-like*, *dmrt-11E*, *dmrt-3*, *dmrt-1*, *idmrt-1*, *idmrt-2* 和 *dsx*)进行了鉴定和初步分析。RNA 干扰研究发现, *dmrt-like* 敲降后, *foxl2* 和 *sox21* 的表达量显著下调; *idmrt-2* 敲降后, 精巢中 *dmrt-like* 和 *foxl2* 基因的表达显著下调, 促雄腺中 *IAG* 的表达也显著下调; *dsx* 敲降后, 卵巢中 *vtg* 和 *vtgR* 表达水平显著下调, 精巢中 *dmrt-like* 和 *dmrt-1* 表达水平显著上调, 促雄腺中 *IAG* 表达水平显著下调^[41, 123-126]。课题组对 *dmrt-1* 和 *dmrt-3* 的进一步研究表明(数据暂未公开), *dmrt-1* 敲降导致精巢中 *foxl-2*、*dmrt-like*、*dmrt-3* 基因和促雄腺中 *IAG* 基因的表达水平显著下调, 差异表达基因主要富集在 Notch 信号通路、MAPK 信号通路、Hippo 信号通路、Calcium 信号通路、Apelin 信号通路; *dmrt-3* 敲降后, 引起精巢中 *foxl-2*、*dmrt-like*、*dmrt-1*、*dsx* 基因和促雄腺中 *IAG* 基因的表达水平显著下调, 差异表达基因主要富集在 Hippo 信号通路、Calcium 信号通路、Apelin 信号通路、mTOR 信号通路。

Dmrt11E 或 *dsx* 敲降导致 *IAG* 表达显著下调, 表明它们可能在“*IAG* 开关”调控信号中发挥上游作用, 并直接或间接影响 *IAG* 的表达参与性别分化^[97, 106]; 通过 *dmrt11E* 的 RNA 长期干扰, 能诱导雄性幼虾完全的功能性性逆转, 性成熟后能与正常雄虾配对繁殖产生全雄群体^[105]。*IAG* 基因沉默使 *idmrt1b* 和 *idmrt1c* 的表达显著下调^[107]; *dmrt99B* 沉默对 *IAG* 表达没有影响^[106], 而 *IAG* 敲降则使 *dmrt99B* 的表达显著下调^[127]。综上, *dmrt* 基因家族成员与 *IAG* 之间有一个复杂的调控网络, 它们在 *IAG* 开关上下游调控和性别分化过程中发挥了重要作用。

1.4.2 *Fem-1* 基因 *Fem-1* (Feminization-1) 首次在秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)中被发现, 是参与雄性和雌雄同体生殖系精子发生的关键调控基因^[128-130]。*Fem-1* 基因包括 3 个成员, 分别是 *fem-1a*、*fem-1b* 和 *fem-1c*, 在不同生物中有不同的变体^[131]。在十足目甲壳动物中, *fem-1* 基因的鉴定分析与相关分子机制研究已陆续报道。这些研究提示 *fem-1* 可能在十足目甲壳动物的早期性别决定以及性腺发育过程中发挥重要作用^[41, 132-139]。其中, 在红螯光壳螯虾中鉴定分析了 *fem-1a*、*fem-1b* 和 *fem-1c*, 其中 *fem-1b* 在卵巢中表达量显著高于其他组织, 并随着卵巢的发育表达量增加。在体 RNA 干扰敲降 *fem-1b* 基因, 导致 *vtg* 的表达显著下调, 这表明 *fem-1b* 可能通过调节 *vtg* 的表达参与到雌性的生殖调节^[140]。中华绒螯蟹中, *fem-1* 在某些组织中表现出一定程度的两性二态表达。在精巢、卵巢、肝胰腺和肌肉中持续检测到较高水平的表达^[141], 对 *fem-1c* 进行在体 RNA 干扰, 引起雌蟹的眼柄神经节和卵巢中 *CFSH-1* 的表达显著下调, 以及雄蟹的促雄腺和精巢中 *IAG* 的表达显著上调^[142], 表明 *fem-1c* 可能作为 *IAG* 和 *CFSH-1* 的上游调控因子, 参与性别分化调控。

1.4.3 *CFSH* 基因 如前所述, *CFSH* 是甲壳动物特有的一种神经激素, 参与雌性的性别分化和第二性征维持。*CFSH* 可能还通过抑制促雄腺中 *IAG* 的表达来调控雄性性别分化^[33, 143-144], 被认为是

IAG 的上游调控因子。在拟穴青蟹中, *CFSH* 通过抑制 *STAT* (signal transmitters and activators of transcription) 表达来抑制 *IAG* 的表达^[145]; 且对拟穴青蟹候选的 *CFSH* 受体基因 *Sp-SEFIR* 进行 RNA 干扰后, 会诱导促雄腺中 *IAG* 和 *STAT* 的表达显著上调^[146]。在三疣梭子蟹中, 雄蟹的 *CFSH* 主要表达于眼柄, 其次是脑和精巢, 研究认为 *CFSH* 可能通过“*CFSH-IAG-精巢*”内分泌轴负调控精子发生和精巢发育, 也可能直接作用于精巢, 其信号系统类似于 *MIH* 的信号通路^[147]。因此, *CFSH* 除了在雌性的眼柄和卵巢中表达外, 促雄腺和精巢可能也是其重要的靶器官, 而最近的证据支持 *CFSH* 和 *IAG* 之间可能存在负反馈调节^[104,143,148]。

1.4.4 *Foxl2* 基因 *Foxl2* (forkhead box protein L2) 是 Fox 基因家族重要成员之一, 其特征是具有高度保守叉头框(forkhead box) DNA 结合结构域^[149], 是哺乳动物卵巢发育启动的标志性基因之一, 在脊椎动物卵巢发育和雌性特征的维持方面有重要作用^[150-153]。相比于其他动物, *foxl2* 基因在甲壳动物中的研究报道还较少。在已报道的十足目甲壳动物中, *foxl2* 在多个组织中表达, 但表达模式稍有不同。在日本沼虾中, *foxl2* 在促雄腺、眼柄、精巢和卵巢等多个组织中表达, 其中精巢中的表达量显著高于卵巢^[154]。在罗氏沼虾中, *foxl2* 在精巢、输精管和卵巢中高表达, 卵巢发育过程中在卵巢 I 期表达量最高。*foxl2* mRNA 原位杂交结果表明, 输精管上皮细胞、精母细胞和卵母细胞中都检测到阳性信号^[155]。在中华绒螯蟹中, *foxl2* 在多个组织中表达, 但卵巢中的表达量显著高于精巢与其他各组织。右侧眼柄切除后, *foxl2*、*ddx20* 和 *FTZ-F1* mRNA 的表达显著上调。通过免疫共沉淀证实 *FOXL2* 与 *DDX20* 或 *FTZ-F1* 之间存在相互作用^[156]。在三疣梭子蟹中, *foxl2* 也在多个组织中表达, 但卵巢中的表达量显著高于精巢及其他各组织。切除眼柄后, *foxl2* 的表达出现显著下调; RNA 干扰该基因后, 卵巢 *vtg* 基因的表达显著上调^[157]。

拟穴青蟹中^[98,158-160], *foxl2* 主要表达于性腺中, 且精巢中的表达量显著高于卵巢。此外, 在 3

个早期发育阶段中(溞状幼体 V 期、大眼幼体和仔蟹 I 期), *foxl2* 在大眼幼体时期的表达量最高。在拟穴青蟹 *vtg* 基因的启动子区域发现了潜在的 *FOXL2* 结合位点, *foxl2* 基因敲降后, *vtg* 在卵巢中的表达显著上调。细胞共转染和 RNA 干扰实验表明, *foxl2* 对 *IAG* 也有负调控作用, 抑制 *IAG* 的表达^[98]。另外, 首次通过比较卵巢或精巢中 RNA 干扰(分别注射 EGFP 和 *foxl2* siRNA)的转录组数据, 分析研究了 *foxl2* 在甲壳动物中的功能。卵巢组织中发现 645 个差异表达基因, 包括几个卵巢发育关键基因, 如 *vtg*、*vtgR* (vitellogenin receptor, 卵黄蛋白原受体)、*AC* (adenylate cyclase, 腺苷酸环化酶)、*cyclinB* 和 *cdc2*, 这些差异表达基因还富集于卵巢发育相关通路, 包括松弛素信号通路、卵巢类固醇生成和孕酮介导的卵母细胞成熟相关信号通路; 精巢组织中共发现有 7892 个差异表达基因, 其中包括大量参与精巢发育的关键基因, 如 *dmrt* 基因家族、*sox* 基因家族、*caspase* 基因家族、*cdk* 基因家族、*kinesin* 基因家族等。进一步的分析表明, 这些差异表达基因在精子发生的关键通路中富集, 如 DNA 复制、细胞周期、同源重组、减数分裂和细胞分裂细胞凋亡等^[161]。

以上研究表明, *foxl2* 受眼柄相关因子的调控, 可能是 *vtg* 和 *IAG* 的上游负调控因子, 并在十足目甲壳动物的性别分化和性腺发育中发挥重要作用。

1.4.5 *Masc* 基因 *Masc* (masculinizer gene) 位于 Z 染色体上, 编码一个 Cys-Cys-Cys-His 串联锌指蛋白, 控制鳞翅目雄性化和剂量补偿效应, 在性别决定中有重要作用^[162]。*Masc* 在甲壳动物中的同源基因研究报道还较少。在丰年虫(*Artemia franciscana*)中, 首次鉴定报道甲壳动物 *masc* 基因, 通过 RNA 干扰沉默 *masc* 基因, 导致雌性比例显著提高, 表明 *masc* 可能参与了雄性性别决定与分化过程^[163]。罗氏沼虾中, 首次报道了十足目的 *masc* 同源基因^[164], 该基因高表达于胸神经节、肠道、输精管、精巢和卵巢中。*masc* 基因沉默使 *foxl2* 的表达显著下调, 表明 *masc* 可能对 *foxl2* 的表达有正向调控作用; 进一步地, 在雄性仔虾阶

段,长期 RNA 干扰 *masc* 基因,使其性逆转为功能性的伪雌虾,并成功产生全雄子代。此外,通过对 *masc* 基因敲降的比较转录组分析,一些显著表达的转录本被富集,并聚焦了关键信号通路的影响,如胰岛素样信号通路、表皮生长因子、IGFBP、Flotillin 蛋白、Sxl、Foxl2 和 HSP 蛋白家族等。

本课题组在拟穴青蟹的 *masc* 基因(数据未公开)主要研究结果表明,*masc* 基因在精巢中的表达量远高于卵巢;原位杂交结果显示,*masc* mRNA 阳性杂交信号在精原细胞、精母细胞、精细胞和精子中均有分布;RNA 干扰敲降 *masc* 基因后的精巢转录组测序和 qRT-PCR 结果表明,*dsx* 和 *DDX5* 等雄性相关基因表达量下调。此外,通过 RNA 干扰敲降 *DDX5* 基因后,发现精巢组织中 *foxl2*、*dmrt-like* 和 *idmrt-2* 表达显著下调,*dsx* 表达显著上调^[165]。

这些研究表明,*masc* 基因在甲壳动物复杂的内分泌轴或性别分化调控网络中位于上游,可能参与调控性别决定与分化。

2 十足目甲壳动物性别控制与性别鉴定

在沼虾、小龙虾、龙虾、蟹类等,雄性个体具有明显的生长优势,而在凡纳对虾和斑节对虾(*P. monodon*)中,雌性个体则具有更显著的生长优势。具有雄性生长优势的物种如罗氏沼虾和红螯光壳蟹,在高密度养殖条件下,全雌养殖群体可能比全雄养殖群体更实用,因为雌性不具备强的攻击性和领地行为,有更高的成活率和规格均匀度,这更适宜高密度养殖模式。又如长久以来,人们对不同生长、生理阶段的青蟹都有消费需求,如肉蟹、奄仔蟹、重壳蟹、软壳蟹、膏蟹以及黄油蟹,已形成了丰富的消费文化,其中奄仔蟹(指尚未交配的雌蟹)因其味道滑嫩、甘香鲜美而广受消费者追捧,若有单性雌蟹群体进行养殖则更具规模化优势,从而提高养殖经济效益。因此,无论是全雄养殖还是全雌养殖,都有潜在的经济价值,对其需求的增加,推动了基于性别控制的相关生物技术的发展。在鱼类养殖中,通过培养全雄或全雌个体获得更高产量的技术已成功得到应用。已经明确在早期发育阶段,性

别分化尚未开始时,个体对性激素等处理非常敏感,是实现性逆转稳定获得单性群体的关键时期。

直接性反转获得单性群体的方法需用大量的激素或生物化学物质处理,而间接干预方法是最有益的,虽然亲本通常仍涉及激素或药物处理,但子代群体并没有处理,相较于直接性反转的方法,更为安全高效,可用于规模化单性群体制种。无论是直接或间接的方法,处理时期是性逆转成功的关键。而间接雄性化或雌性化在理论上是可能的,但在不同性别决定系统(ZW 和 XY)中,间接雌性化/雄性化的表现和经济效率的可行性有待深入研究。此外,类固醇激素(MT 和 17 β -雌二醇等)或其他化学物质(DA 和 5-HT 等)参与甲壳动物的性别控制机制尚不完全清楚,需要进一步研究。

2.1 性别控制获得单性群体

2.1.1 激素诱导性逆转 外源性激素处理是性别控制的常用方法之一,通过激素诱导的雌性化或雄性化方法,不需要考虑是何种雌雄异配型的性别决定模式,可应用于大多数物种。研究表明,脊椎动物的性激素也可以影响十足目甲壳动物性别分化,甚至造成性逆转。E2 能促进小龙虾的卵黄发生^[166],并诱导甲壳动物的雌性化^[167]。在罗氏沼虾中,通过投喂不同含量 MT 处理的卤虫无节幼体 50 d,雄性幼虾的性别比例显著提高^[168]。在日本沼虾中,在日龄 25 d 仔虾的饲料中 E2 添加量 200 mg/kg,养殖投喂 40 d,实验组获得了相比于对照组雌性率高的群体^[169];通过在饲料中添加不同浓度(分别为 50、100、200 mg/kg)的 MT,雄性比例随 MT 浓度的提升而提高^[170]。在 200 mg/kg 时雄雌性别比例为 2.61 : 1,性腺组织切片显示该浓度处理下存在部分精巢-卵巢共存的个体,而在雄虾中 *dmrt11E*、*foxl2* 和 *soxE1* 性别分化相关基因的表达量分别是未处理对照组的 8.65 倍、3.75 倍和 3.45 倍。同样在日本沼虾中^[171],E2 的处理抑制了 *IAG* 的表达,500 mg/kg 浓度的 E2 和 MT 处理可分别显著提高雄、雌幼虾的生长性能;浓度 ≥ 500 mg/kg 的 E2 和 MT 分别处理雄虾和雌虾,则阻碍了精巢和卵巢的发育。

红螯光壳蟹中,通过虾苗口服含 MT (50 mg/kg)

的饲料来提高雄性率,结果表明,相比于对照组 24.93%的雄性率,实验组提高到 59.96%,且对成活率没有显著影响^[172];通过花刺参(*Stichopus variegatus*)类固醇提取物(sea cucumber steroid extract, SCSE) 2 mg/L 浓度浸泡 18 h,养殖 50 d,雄性率从 31.03% (对照组)提高至 79.86%,浓度 50 mg/kg 的 SCSE 口服饲喂 50 d,雄性率为 75.16%^[173];利用 SCSE 以及蜂蜜对红螯光壳螯虾进行雄性化实验处理 40 d,当 SCSE 添加量为 2 mg/L、蜂蜜剂量为 20 mL/L 时,雄性率最高达到 83.75%^[174];进一步研究表明,SCSE 具有剂量依赖性,能促进幼虾雄性生殖系统的形成,提高精巢的 MT 水平,SCSE 剂量和幼虾不同浸泡时间的组合对其生长和 MT 水平有显著影响^[175]。

以上研究为外源类固醇激素诱导十足目甲壳动物性逆转建立单性群体提供了参考依据,但还需进一步开展相关研究,从而确定使用剂量和处理时间,确保性逆转的高效性和生物安全性,为控制定向性别分化、揭示诱导十足目甲壳动物性逆转的调控机制提供理论基础与实践基础。若激素诱导的方法再结合性别特异分子标记,对性转群体的遗传性别进行鉴定,制备候选伪雄/伪雌亲本,就可用于单性群体的规模化制种。

2.1.2 多倍体诱导与性别控制 通过抑制减数分裂 I 或 II 期诱导形成三倍体,可使凡纳对虾、中国对虾和日本对虾的雌性性别比例提高^[176-180]。其中温度休克法所需的条件与设施简单,操作简便易行,处理量大,具备应用于规模化生产单性群体的潜力。

2.1.3 IAG 及相关基因沉默与规模化制种 促雄腺和 IAG 是十足目甲壳动物性别控制研究的重点。通过干预促雄腺和 RNA 干扰技术诱导 IAG 等性别决定与分化相关基因沉默,结合可靠的性别特异分子标记,在罗氏沼虾中陆续实现了功能完整的性逆转^[96,105,111,164,181-183],并应用于全雄群体生产研究,这在水产养殖中具有重要的应用价值。而将促雄腺的细胞悬液注射到幼虾中,可导致个体完全的性逆转,发育为成熟雄性^[64]。通过罗氏沼虾血细胞原代细胞培养开展规模化生产

IAG 的研究,以及通过化学合成或重组蛋白表达系统制备 IAG 肽的研究,为取代促雄腺细胞悬液的传统制备方法以及全雌群体的规模化生产奠定了技术基础^[184]。但无论是幼虾时期的 dsRNA/siRNA 或细胞悬液注射,还是促雄腺的摘除和移植,实际应用起来都较为困难,不能做到性激素拌料投喂诱导性逆转那样简便。研究者们尝试通过注射、口服、转染、浸泡等各种 RNA 分子传递方式,不断研究和开发新的 RNA 给药方法,以提高给药方法的效率,并最大限度地减少其不良副作用或局限性,而通过脂质体、微藻和细菌等作为核酸分子载体的口服饲喂方式,为十足目甲壳动物通过 RNA 干扰方法诱导性逆转提供了新的研究思路与方向,具有极大的应用价值^[185]。基于 RNA 干扰的生物技术方法原理,注射 7 d 后 dsRNA 或 siRNA 会逐渐消失,因此被认为是安全的,但也有可能会触发机体免疫反应和产生脱靶效应^[185-186]。因此, RNA 干扰技术在水产养殖中有一定局限性,而且体外制备 RNA 干扰的核酸分子成本高,这进一步限制其应用推广。而 RNA 干扰在性别控制和抗病等多个方面具有广泛的应用前景^[187],利用细菌、酵母和微藻等通过生物体内合成获得大量 dsRNA 分子的研究逐渐受到关注^[188-190],为其规模化应用提供了可能。

理论上,对于雌性异配 ZW 型性别决定的物种,全雄群体可以通过两步程序获得:第一步雄性(♂ ZZ)性逆转为伪雌虾(♀ ZZ),第二步与正常雄性(♂ ZZ)交配,获得遗传性别为全雄(♂ ZZ)的群体;全雌群体可以通过三步程序获得:第一步雌性(♀ ZW)性逆转为伪雄虾(♂ ZW),第二步与正常雌虾(♀ ZW)交配获得超雌个体(♀ WW),第三步 WW 个体再与正常雄虾(♂ ZZ)交配,获得遗传性别为全雌(♀ ZW)的群体。对于雄性异配 XY 型性别决定的物种,全雄群体可以通过三步程序获得:第一步雄性(♂ XY)性逆转为伪雌虾(♀ XY),第二步与正常雄虾交配,获得超雄个体(♂ YY),第三步超雄个体与正常雌虾(♀ XX)交配,获得遗传性别为全雄(♂ XY)的群体;全雌群体则可以通过两步程序获得:第一步雌性(♀ XX)性逆转为伪

雄虾(♂ XX), 第二步与正常雌虾(♀ XX)交配, 获得遗传性别为全雌(♀ XX)的群体。

基于 *IAG* 及其上游调控基因和促雄腺的生物技术获得全雄或全雌个体的方法, 目前仅在雌性异配 ZW 性别决定模式的物种中成功开展了相关研究, 相比于鱼类单性育种研究较为滞后。一方面, 十足目甲壳动物的遗传基础研究滞后, 相关理论基础缺乏, 激素诱导性逆转的方法也尚未取得实质性突破, 十足目甲壳动物需要较为繁琐的手术操作方法才能获得伪雄性(♂ ZW 或 ♂ XX)或伪雌性(♀ ZZ 或 ♀ XY); 另一方面, 大多数十足目甲壳动物缺乏可靠的性别特异分子标记, 超雌个体(♀ WW)和超雄个体(♂ YY)的筛选鉴定以及后裔测定, 目前并没有高效的方法。

2.2 性别分子标记开发与遗传性别鉴定

随着分子生物学和高通量测序技术的发展, 各种遗传技术已越来越多地应用于鉴定十足目甲壳动物的性别特异 DNA 序列和标记。三疣梭子蟹中, 基于高密度遗传连锁图谱的性别 QTL 定位(quantitative trait locus mapping)的鉴定与分析, 以及简化基因组测序获得性别连锁 SNP 位点, 证实其为 XX/XY (雄性异配型)性别决定系统, 并挖掘到可靠的性别特异分子标记^[191-193]。同样地, 在花蟹(*Charybdis feriatus*)中发现了 5 个雄性特异性单核苷酸多态性(single Nucleotide Polymorphism, SNP)标记, 为花蟹的 XX/XY 性别决定模式提供了可靠的分子遗传证据^[194]。SNP 性别特异分子标记和高密度遗传连锁图谱为拟穴青蟹、紫螯青蟹(*S. tranquebarica*)、锯缘青蟹、红螯光壳螯虾、中华绒螯蟹等的雌性异配 ZW 型性别决定模式提供了分子证据^[195-198]。Shi 等^[195]根据雌性特异性核苷酸成功设计了雌性特异性引物, 该引物可以扩增来自雌性的预期条带, 而不能扩增来自雄性的预期条带。由此, 建立了一种快速有效的拟穴青蟹分子性别鉴定方法, 同时, 该方法可以成功地鉴定紫螯青蟹和锯缘青蟹的性别。在中华绒螯蟹中, Liu 等^[199]构建了中华绒螯蟹深覆盖基因组 BAC 文库(bacterial artificial chromosome library), 首次鉴定出中华绒螯蟹性别特异分子标记, 并据此建立了基于 PCR 的遗传性别鉴定方法。在红螯

光壳螯虾中, 开发了 5 个性别特异标记, 其中一对 Z/W-76567 性别标记通过 PCR 反应和凝胶电泳分析, 能够区分 ZZ 和 ZW 遗传性别, 即 ZZ 在电泳结果中为一条特异条带, ZW 为两条, 这些为红螯光壳螯虾的单性育种奠定了基础^[197]。

稳定的性别特异分子标记对十足目甲壳动物早期遗传性别鉴定及单性养殖研究至关重要。随着甲壳动物基因组测序和组装的陆续完成, 在构建了高质量的基因组图谱的基础上, 加快性别特异分子标记筛选与验证工作, 将有助于十足目甲壳动物性别控制与单性育种研究。

3 展望

本文综述了十足目甲壳动物性别决定和分化分子调控机制的研究进展, 总结了在其中发挥重要作用的关键因素。同时, 还探讨了获得十足目甲壳动物单性群体的性别控制方案。这些研究对于实现十足目甲壳动物规模化单性苗种生产和养殖具有一定参考价值。随着 CRISPR/Cas9 基因编辑技术的广泛研究与应用, 十足目甲壳动物中也取得了一定的进展。Gui 等^[200]开发了脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)的显微注射方法, 成功地将 CRISPR/Cas9 技术应用于脊尾白虾的基因编辑, 结果表明获得的这些突变可以稳定遗传给下一代。Song^[201]通过 CRISPR/Cas9 基因编辑成功构建 MIH 敲除系, 为深入研究 MIH 基因的功能奠定了良好基础。同样在脊尾白虾中, Gao 等^[202]通过 CRISPR/Cas9 基因编辑技术, 获得了一种胰岛素样肽(ILP)的敲除系, 其生长抑制特性和死亡率显著高于正常对照组, 而 RNA 干扰敲降 ILP 组也表现为生长速度缓慢, 死亡率较高的特征, 从侧面验证了基因编辑实验结果的准确性。而 *IAG* 作为一种胰岛素样肽, 使用 CRISPR/Cas9 基因编辑方法, 应也能成功构建 *IAG* 敲除系, 从而对其进行功能分析和应用研究。利用基因编辑技术进行性别控制是未来十足目甲壳动物单性育种研究的重要方向之一, 也是研究性别决定和分化相关基因的重要技术手段。

参考文献:

- [1] Mohanakumaran Nair C, Salin K R, Raju M S, et al.

- Economic analysis of monosex culture of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii* de Man): A case study[J]. *Aquaculture Research*, 2006, 37(9): 949-954.
- [2] Li F J. Cloning of insulin-like androgenic glandhormone gene and related gene and investigation of their regulation relationship in *Macrobrachium nipponense*[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2015. [李法君. 青虾 IAG 及相关基因的克隆及调控关系的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2015.]
- [3] Bardera G, Owen M A G, Façanha F N, et al. The influence of sex on feeding behaviour in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)[J]. *Applied Animal Behaviour Science*, 2020, 224: 104946.
- [4] Hidir A, Aaqillah-Amr M A, Azra M N, et al. Sexual dimorphism of mud crab, genus *Scylla* between sexes based on morphological and physiological characteristics[J]. *Aquaculture Research*, 2021, 52(12): 5943-5961.
- [5] Ge Y C, Wu X G, Jiang X D, et al. Effects of mono-sex culture on the culture performance and gonad development of pre-adult *Eriocheir sinensis*[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2017, 26(2): 221-226. [葛永春, 吴旭干, 姜晓东, 等. 河蟹雌雄分养对其亚成体养殖性能和性腺发育的影响[J]. 上海海洋大学学报, 2017, 26(2): 221-226.]
- [6] Peng B, Tan Y F, Peng G H, et al. Path analysis of effects of phenotypic traits attributes on abdomen meat weight of red swamp crayfish *Procambarus clarkii*[J]. *Fisheries Science*, 2021, 40(5): 718-725. [彭波, 谭云飞, 蓬国辉, 等. 克氏原螯虾体征性状与肌肉质量的相关及通径分析[J]. 水产科学, 2021, 40(5): 718-725.]
- [7] Rodgers L J, Saoud P I, Rouse D B. The effects of monosex culture and stocking density on survival, growth and yield of redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) in earthen ponds[J]. *Aquaculture*, 2006, 259(1-4): 164-168.
- [8] Li J W. A review of sexual determination and differentiation in crustacean[J]. *Journal of Biosciences and Medicines*, 2022, 10(7): 19-37.
- [9] Ventura T. Monosex in aquaculture[J]. *Results and Problems in Cell Differentiation*, 2018, 65: 91-101.
- [10] Waiho K, Fazhan H, Ikhwanuddin M, et al. Chromosomal sex determination system in brachyurans and its potential application in aquaculture[J]. *Aquaculture*, 2021, 543: 736990.
- [11] Ventura T, Rosen O, Sagi A. From the discovery of the crustacean androgenic gland to the insulin-like hormone in six decades[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2011, 173(3): 381-388.
- [12] Ventura T, Sagi A. The insulin-like androgenic gland hormone in crustaceans: From a single gene silencing to a wide array of sexual manipulation-based biotechnologies[J]. *Biotechnology Advances*, 2012, 30(6): 1543-1550.
- [13] Harlioğlu M M, Farhadi A. Feminization strategies in crustacean aquaculture[J]. *Aquaculture International*, 2017, 25(4): 1453-1468.
- [14] Jiang J P, Yuan X, Qiu Q Q, et al. Research progress of sex-related genes and research status of monosex culture in *Macrobrachium rosenbergii*: A review[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2019, 50(9): 2111-2118. [姜建萍, 袁翔, 邱庆庆, 等. 罗氏沼虾性别相关基因研究进展及其单性化养殖现状[J]. 南方农业学报, 2019, 50(9): 2111-2118.]
- [15] Tan K, Jiang H G, Jiang D H, et al. Sex reversal and the androgenic gland (AG) in *Macrobrachium rosenbergii*: A review[J]. *Aquaculture and Fisheries*, 2020, 5(6): 283-288.
- [16] Zheng H K, Xie X, Zheng L, et al. Research advance in functions and related mechanisms of insulin-like androgenic gland hormone in crustaceans[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2020, 55(5): 670-680. [郑宏坤, 谢熙, 郑亮, 等. 甲壳动物胰岛素样促雄腺激素功能及作用机制的研究进展[J]. 动物学杂志, 2020, 55(5): 670-680.]
- [17] Levy T, Sagi A. The “IAG-switch”—A key controlling element in decapod crustacean sex differentiation[J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2020, 11: Article No.651.
- [18] Sun R, Li Y H. A sex-reversing factor: Insulin-like androgenic gland hormone in decapods[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2021, 13(3): 1352-1366.
- [19] Farhadi A, Cui W X, Zheng H P, et al. The regulatory mechanism of sexual development in decapod crustaceans[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2021, 8: Article No.679687.
- [20] Toyota K, Miyakawa H, Hiruta C, et al. Sex determination and differentiation in decapod and cladoceran crustaceans: An overview of endocrine regulation[J]. *Genes*, 2021, 12(2): Article No.305.
- [21] Harlioğlu M M, Farhadi A. Androgenic hormones in crustacean aquaculture: A review[J]. *Turkish Journal of Zoology*, 2022, 46(3): 237-248.
- [22] Nguyen A H T, Glendinning S, Ventura T. A refined roadmap to decapod sexual manipulation[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2023, 15(4): 1654-1663.
- [23] Ye Z Q, Bishop T, Wang Y H, et al. Evolution of sex determination in crustaceans[J]. *Marine Life Science & Technology*, 2023, 5(1): 1-11.
- [24] Ra'Anan Z, Sagi A. Alternative mating strategies in male morphotypes of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de man)[J]. *The Biological Bulletin*, 1985, 169(3): 592-601.
- [25] Ford A T. Intersexuality in Crustacea: An environmental issue?[J]. *Aquatic Toxicology*, 2012, 108: 125-129.
- [26] Yazicioglu B, Reynolds J, Kozák P. Different aspects of

- reproduction strategies in crayfish: A review[J]. Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems, 2016, 417: Article No.33.
- [27] Fletcher D J, Kötter I, Wunsch M, et al. Preliminary observations on the reproductive biology of ornamental cleaner prawns *Stenopus hispidus* *Lysmata amboinensis* *Lysmata debelius*[J]. International Zoo Yearbook, 1995, 34(1): 73-77.
- [28] Levy T, Tamone S L, Manor R, et al. The protandric life history of the Northern spot shrimp *Pandalus platyceros*: Molecular insights and implications for fishery management[J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): Article No.1287.
- [29] Martin P, Dorn N J, Kawai T, et al. The enigmatic marmorkrebs (marbled crayfish) is the parthenogenetic form of *Procambarus fallax* (Hagen, 1870)[J]. Contributions to Zoology, 2010, 79(3): 107-118.
- [30] Zarkower D. Establishing sexual dimorphism: Conservation amidst diversity?[J]. Nature Reviews Genetics, 2001, 2(3): 175-185.
- [31] Zmora N, Chung J S. A novel hormone is required for the development of reproductive phenotypes in adult female crabs[J]. Endocrinology, 2014, 155(1): 230-239.
- [32] Jiang Q L, Lu B, Lin D D, et al. Role of crustacean female sex hormone (CFSH) in sex differentiation in early juvenile mud crabs, *Scylla paramamosain*[J]. General and Comparative Endocrinology, 2020, 289: Article No.113383.
- [33] Liu F, Shi W Y, Huang L, et al. Roles of crustacean female sex hormone 1a in a protandric simultaneous hermaphrodite shrimp[J]. Frontiers in Marine Science, 2021, 8: Article No.791965.
- [34] Ahn I S, Chung J S. Crustacean female sex hormone (CFSH) transcript and protein profiles and its functions in gradually developing adult-specific-features during the prepuberty molt cycle of the blue crab, *Callinectes sapidus*[J]. Journal of Shellfish Research, 2022, 41(3): 389-398.
- [35] Chen T, Zhang L P, Wong N K, et al. Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) vitellogenesis-inhibiting hormone (VIH) is predominantly expressed in the brain and negatively regulates hepatopancreatic vitellogenin (VTG) gene expression[J]. Biology of Reproduction, 2014, 90(3): Article No.47.
- [36] Liu C Y, Jia X W, Zou Z H, et al. VIH from the mud crab is specifically expressed in the eyestalk and potentially regulated by transactivator of Sox9/Oct4/Oct1[J]. General and Comparative Endocrinology, 2018, 255: 1-11.
- [37] Liao J Q, Zhang Z P, Jia X W, et al. Transcriptional regulation of *Vih* by Oct4 and Sox9 in *Scylla paramamosain*[J]. Frontiers in Endocrinology, 2020, 11: 650.
- [38] Wan H F, Liao J Q, Zhang Z P, et al. Molecular cloning, characterization, and expression analysis of a sex-biased transcriptional factor *sox9* gene of mud crab *Scylla paramamosain*[J]. Gene, 2021, 774: 145423.
- [39] Chang E S, Chang S A, Mulder E P. Hormones in the lives of crustaceans: An overview[J]. American Zoologist, 2001, 41(5): 1090-1097.
- [40] Wei Z N. Research progress on regulation of estrogen in crustaceans[J]. China Fisheries, 2015(7): 89-90. [魏泽能. 雌激素对甲壳动物的调控研究进展[J]. 中国水产, 2015(7): 89-90.]
- [41] Gao J, Wang X W, Zou Z H, et al. Transcriptome analysis of the differences in gene expression between testis and ovary in green mud crab (*Scylla paramamosain*)[J]. BMC Genomics, 2014, 15: Article No.585.
- [42] Liu M M. Functional study of estrogen and estrogen related receptor during the ovarian development and lipid metabolism of the swimming crab, *Portunus trituberculatus*[D]. Xiamen: Xiamen University, 2020. [柳梅梅. 雌激素及其相关受体在三疣梭子蟹卵巢发育和脂质代谢过程中的功能研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2020.]
- [43] Zhao M X. Molecular cloning and expression of the estrogen related receptor in *Macrobrachium rosenbergii* and the effect of nonylphenol on its gene expression[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2016. [赵苗鑫. 罗氏沼虾雌激素相关受体的克隆与表达及壬基酚对其表达的影响[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2016.]
- [44] Tinikul Y, Mercier A J, Soonklang N, et al. Changes in the levels of serotonin and dopamine in the central nervous system and ovary, and their possible roles in the ovarian development in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*[J]. General and Comparative Endocrinology, 2008, 158(3): 250-258.
- [45] Tinikul Y, Poljaroen J, Kornthong N, et al. Distribution and changes of serotonin and dopamine levels in the central nervous system and ovary of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, during ovarian maturation cycle[J]. Cell and Tissue Research, 2011, 345(1): 103-124.
- [46] Ma M M, Gard A L, Xiang F, et al. Combining in silico transcriptome mining and biological mass spectrometry for neuropeptide discovery in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. Peptides, 2010, 31(1): 27-43.
- [47] Ngernsounngern A, Ngernsounngern P, Kavanaugh S, et al. The identification and distribution of gonadotropin-releasing hormone-like peptides in the central nervous system and ovary of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Invertebrate Neuroscience, 2008, 8(1): 49-57.
- [48] Fingerman M. Roles of neurotransmitters in regulating reproductive hormone release and gonadal maturation in

- decapod crustaceans[J]. Invertebrate Reproduction & Development, 1997, 31(1-3): 47-54.
- [49] Ohs C L, D'Abramo L R, Petrie-Hanson L, et al. Apparent control of sexual differentiation of freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, through dietary administration of dopamine hydrochloride[J]. Journal of Applied Aquaculture, 2006, 18(4): 19-32.
- [50] Siangcham T, Tinikul Y, Poljaroen J, et al. The effects of serotonin, dopamine, gonadotropin-releasing hormones, and corazonin, on the androgenic gland of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*[J]. General and Comparative Endocrinology, 2013, 193: 10-18.
- [51] Cronin L E. Anatomy and histology of the male reproductive system of *Callinectes sapidus* Rathbun[J]. Journal of Morphology, 1947, 81(2): 209-239.
- [52] Khalaila I, Manor R, Weil S, et al. The eyestalk-androgenic gland-testis endocrine axis in the crayfish *Cherax quadricarinatus*[J]. General and Comparative Endocrinology, 2002, 127(2): 147-156.
- [53] Taketomi Y. Ultrastructure of the androgenic gland of the crayfish, *Procambarus clarkii*[J]. Cell Biology International Reports, 1986, 10(2): 131-136.
- [54] Sagi A, Cohen D, Milner Y. Effect of androgenic gland ablation on morphotypic differentiation and sexual characteristics of male freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii*[J]. General and Comparative Endocrinology, 1990, 77(1): 15-22.
- [55] Wu P, Yang L R, Chong J R, et al. Studies on the male sexual glands of *Macrobrachium nipponense*[J]. Reservoir Fisheries, 2002, 22(5): 21-23. [吴萍, 杨立荣, 崇加荣, 等. 日本沼虾促雄腺的研究[J]. 水利渔业, 2002, 22(5): 21-23.]
- [56] Qiu G F, Wu P, Lou Y D. Structure and function of the androgenic gland in *Eriocheir sinensis*[J]. Journal of Fisheries of China, 2000, 24(2): 108-112. [邱高峰, 吴萍, 楼允东. 中华绒螯蟹促雄腺的结构与功能[J]. 水产学报, 2000, 24(2): 108-112.]
- [57] Ye H H, Li S J, Huang H Y, et al. Histological study on development of androgenic gland in mud crab *Scylla serrata*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2003, 10(5): 376-380. [叶海辉, 李少菁, 黄辉洋, 等. 锯缘青蟹促雄腺发育的组织学研究[J]. 中国水产科学, 2003, 10(5): 376-380.]
- [58] Zhao G F, Li G L, Zhu C H. A preliminary observation on histological of androgenic gland of *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2010, 30(6): 74-77. [赵光凤, 李广丽, 朱春华. 凡纳滨对虾促雄性腺的组织学初步观察[J]. 广东海洋大学学报, 2010, 30(6): 74-77.]
- [59] Zhou T T. Molecular characterization of the insulin-like androgenic gland hormone gene (*FmLAG*) from the shrimp *Fenneropenaeus merguensis*[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2018. [周婷婷. 墨吉对虾胰岛素样促雄性腺激素基因(*FmLAG*)的分子特征研究[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2018.]
- [60] Li F H, Xiang J H. Preliminary study on the morphological structure and function of male androgenic gland in *Penaeus chinensis*[J]. Chinese Science Bulletin, 1996, 41(15): 1418-1422. [李富花, 相建海. 中国对虾促雄腺形态结构和功能的初步研究[J]. 科学通报, 1996, 41(15): 1418-1422.]
- [61] Liu H, Cheung K C, Chu K H. Cell structure and seasonal changes of the androgenic gland of the mud crab *Scylla paramamosain* (Decapoda: Portunidae)[J]. Zoological Studies, 2008, 47(6): 720-732.
- [62] Aflalo E D, Hoang T T T, Nguyen V, et al. A novel two-step procedure for mass production of all-male populations of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Aquaculture, 2006, 256(1-4): 468-478.
- [63] Manor R, Aflalo E D, Segall C, et al. Androgenic gland implantation promotes growth and inhibits vitellogenesis in *Cherax quadricarinatus* females held in individual compartments[J]. Invertebrate Reproduction & Development, 2004, 45(2): 151-159.
- [64] Levy T, Rosen O, Eilam B, et al. A single injection of hypertrophied androgenic gland cells produces all-female aquaculture[J]. Marine Biotechnology, 2016, 18(5): 554-563.
- [65] Khalaila I, Katz T, Abdu U, et al. Effects of implantation of hypertrophied androgenic glands on sexual characters and physiology of the reproductive system in the female red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus*[J]. General and Comparative Endocrinology, 2001, 121(3): 242-249.
- [66] Barki A, Karplus I, Khalaila I, et al. Male-like behavioral patterns and physiological alterations induced by androgenic gland implantation in female crayfish[J]. Journal of Experimental Biology, 2003, 206(11): 1791-1797.
- [67] De Bock M S, López Greco L S. Sex reversal and growth performance in juvenile females of the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (Parastacidae): Effect of increasing temperature and androgenic gland extract in the diet[J]. Aquaculture International, 2010, 18(2): 231-243.
- [68] Barki A, Karplus I, Manor R, et al. Intersexuality and behavior in crayfish: The de-masculinization effects of androgenic gland ablation[J]. Hormones and Behavior, 2006, 50(2): 322-331.
- [69] Malecha S R, Nevin P A, Ha P, et al. Sex-ratios and sex-determination in progeny from crosses of surgically sex-reversed freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Aquaculture, 1992, 105(3-4): 201-218.

- [70] Rungsin W, Paankhao N, Na-Nakorn U. Production of all-male stock by neofemale technology of the Thai strain of freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Aquaculture, 2006, 259(1-4): 88-94.
- [71] Subramoniam T. Sexual biology and reproduction in crustaceans[M]. London: Academic Press, 2017: 57-59.
- [72] Nagamine C, Knight A W, Maggenti A, et al. Effects of androgenic gland ablation on male primary and secondary sexual characteristics in the Malaysian prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) (Decapoda, Palaemonidae), with first evidence of induced feminization in a nonhermaphroditic decapod[J]. General and Comparative Endocrinology, 1980, 41(4): 423-441.
- [73] Sagi A, Snir E, Khalaila I. Sexual differentiation in decapod crustaceans: Role of the androgenic gland[J]. Invertebrate Reproduction & Development, 1997, 31(1-3): 55-61.
- [74] Sroyraya M, Chotwiwatthanakun C, Stewart M J, et al. Bilateral eyestalk ablation of the blue swimmer crab, *Portunus pelagicus*, produces hypertrophy of the androgenic gland and an increase of cells producing insulin-like androgenic gland hormone[J]. Tissue and Cell, 2010, 42(5): 293-300.
- [75] Kim D H, Jo Q, Kim B K, et al. Eyestalk ablation-induced androgenic gland activity and gonad development in the freshwater prawns *Macrobrachium nipponense* (De Haan, 1849)[J]. Invertebrate Reproduction & Development, 2002, 42(1): 35-42.
- [76] Zhou T T, Wang W, Wang C G, et al. Insulin-like androgenic gland hormone from the shrimp *Fenneropenaeus merguensis*: Expression, gene organization and transcript variants[J]. Gene, 2021, 782: 145529.
- [77] Chen K X, Li S H, Li F H. Regulatory mechanisms of the eyestalk-androgenic gland-testis endocrine axis on testis development in *Litopenaeus vannamei*[J]. Marine Sciences, 2021, 45(11): 62-72. [陈康轩, 李诗豪, 李富花. 凡纳滨对虾“眼柄-促雄性腺-精巢”内分泌轴调控精巢发育的分子机制研究[J]. 海洋科学, 2021, 45(11): 62-72.]
- [78] Zhong P, Zhou T T, Zhang Y, et al. Potential involvement of a DMRT family member (*Mr-Dsx*) in the regulation of sexual differentiation and moulting in the giant river prawn *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Aquaculture Research, 2019, 50(10): 3037-3049.
- [79] Tang M Z, Lu Z J, Qin Z D, et al. Examination of the potential role of CHH in regulating the expression of *IAGBP* gene through the eyestalk-testis pathway[J]. Aquaculture, 2022, 547: 737455.
- [80] Tang M Z, Lu Z J, Babu S V, et al. The regulatory relationships between the gonad-inhibiting hormone and insulin-like androgenic gland hormone-binding protein genes in the eyestalk-androgenic gland-testis axis of *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Frontiers in Marine Science, 2021, 8: 775191.
- [81] Li F J, Bai H K, Zhang W Y, et al. Cloning of genomic sequences of three crustacean hyperglycemic hormone superfamily genes and elucidation of their roles of regulating insulin-like androgenic gland hormone gene[J]. Gene, 2015, 561(1): 68-75.
- [82] Guo D H, Li S J, Lin Y S. Advances in the studies of crustacean androgenic gland hormone[J]. Marine Science, 2006, 30(11): 88-92. [郭东晖, 李少菁, 林元烧. 甲壳动物促雄性腺激素研究进展[J]. 海洋科学, 2006, 30(11): 88-92.]
- [83] Manor R, Weil S, Oren S, et al. Insulin and gender: An insulin-like gene expressed exclusively in the androgenic gland of the male crayfish[J]. General and Comparative Endocrinology, 2007, 150(2): 326-336.
- [84] Ventura T, Manor R, Aflalo E D, et al. Temporal silencing of an androgenic gland-specific insulin-like gene affecting phenotypical gender differences and spermatogenesis[J]. Endocrinology, 2009, 150(3): 1278-1286.
- [85] Li S H, Li F H, Sun Z, et al. Two spliced variants of insulin-like androgenic gland hormone gene in the Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*[J]. General and Comparative Endocrinology, 2012, 177(2): 246-255.
- [86] Ventura T, Fitzgibbon Q, Battaglene S, et al. Identification and characterization of androgenic gland specific insulin-like peptide-encoding transcripts in two spiny lobster species: *Sagmariasus verreauxi* and *Jasus edwardsii*[J]. General and Comparative Endocrinology, 2015, 214: 126-133.
- [87] Huang X S, Ye H H, Huang H Y, et al. An insulin-like androgenic gland hormone gene in the mud crab, *Scylla paramamosain*, extensively expressed and involved in the processes of growth and female reproduction[J]. General and Comparative Endocrinology, 2014, 204: 229-238.
- [88] Xiao M N, Xu J N, Cai S L, et al. Preliminary study on isolation and purification of the androgenic gland hormone of *Eriocheir sinensis*[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2010, 19(1): 28-33. [肖美南, 徐佳念, 蔡生力, 等. 中华绒螯蟹促雄性腺素分离、纯化的初步研究[J]. 上海海洋大学学报, 2010, 19(1): 28-33.]
- [89] Katayama H, Toyota K, Tanaka H, et al. Chemical synthesis and functional evaluation of the crayfish insulin-like androgenic gland factor[J]. Bioorganic Chemistry, 2022, 122: 105738.
- [90] Katayama H, Nagasawa H. Chemical synthesis of N-glycosylated insulin-like androgenic gland factor from the fresh-

- water prawn *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Journal of Peptide Science, 2019, 25(11): e3215.
- [91] Katayama H, Mukainakano T, Kogure J, et al. Chemical synthesis of the crustacean insulin-like peptide with four disulfide bonds[J]. Journal of Peptide Science, 2018, 24(12): e3132.
- [92] Katayama H, Kubota N, Hojo H, et al. Direct evidence for the function of crustacean insulin-like androgenic gland factor (IAG): Total chemical synthesis of IAG[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2014, 22(21): 5783-5789.
- [93] Aizen J, Chandler J C, Fitzgibbon Q P, et al. Production of recombinant insulin-like androgenic gland hormones from three decapod species: *In vitro* testicular phosphorylation and activation of a newly identified tyrosine kinase receptor from the Eastern spiny lobster, *Sagmariasus verreauxi*[J]. General and Comparative Endocrinology, 2016, 229: 8-18.
- [94] Rosen O, Manor R, Weil S, et al. A sexual shift induced by silencing of a single insulin-like gene in crayfish: Ovarian upregulation and testicular degeneration[J]. PLoS One, 2010, 5(12): e15281.
- [95] Priyadarshi H, Das R, Pavan-Kumar A, et al. Silencing and augmentation of *IAG* hormone transcripts in adult *Macrobrachium rosenbergii* males affects morphotype transformation[J]. Journal of Experimental Biology, 2017, 220(22): 4101-4108.
- [96] Ventura T, Manor R, Aflalo E D, et al. Timing sexual differentiation: Full functional sex reversal achieved through silencing of a single insulin-like gene in the prawn, *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Biology of Reproduction, 2012, 86(3): Article No.90.
- [97] Li S H, Li F H, Yu K J, et al. Identification and characterization of a *doublesex* gene which regulates the expression of insulin-like androgenic gland hormone in *Fenneropenaeus chinensis*[J]. Gene, 2018, 649: 1-7.
- [98] Liao J Q, Wan H F, Zhang Z P, et al. Transcriptional regulation of *IAG* by *dsx* and *foxl-2* in mud crab (*Scylla paramamosain*)[J]. General and Comparative Endocrinology, 2024, 345: 114396.
- [99] Jiang Q H, Xu D J, Wang M, et al. Molecular characterization of a male-specific *SoxE* gene in the swimming crab, *Portunus trituberculatus*, and transcriptional interaction with insulin-like androgenic gland hormone[J]. Fishes, 2023, 8(7): Article No.351.
- [100] Zhou L H. Identification and functional analysis of the genes related to molting and sexual regulation in *Exopalaemon carinicauda*[D]. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2016. [周丽红. 脊尾白虾蜕皮和性别调控相关基因的鉴定及功能分析[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2016.]
- [101] Lin D W, Guo Y J, Chen X L, et al. Identification and expression pattern of the sex determination gene *fruitless-like* in *Cherax quadricarinatus*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2022, 259: 110704.
- [102] Ryner L C, Goodwin S F, Castrillon D H, et al. Control of male sexual behavior and sexual orientation in *Drosophila* by the *fruitless* gene[J]. Cell, 1996, 87(6): 1079-1089.
- [103] Yamamoto D, Koganezawa M. Genes and circuits of courtship behaviour in *Drosophila* males[J]. Nature Reviews Neuroscience, 2013, 14(10): 681-692.
- [104] Liu F, Shi W Y, Ye H H, et al. Insulin-like androgenic gland hormone 1 (*IAG1*) regulates sexual differentiation in a hermaphrodite shrimp through feedback to neuroendocrine factors[J]. General and Comparative Endocrinology, 2021, 303: Article No.113706.
- [105] Xu H J, Chen Y L, Wang Y M, et al. Full functional sex reversal achieved through silencing of *MroDmrt11E* gene in *Macrobrachium rosenbergii*: Production of all-male monosex freshwater prawn[J]. Frontiers in Endocrinology, 2022, 12: 772498.
- [106] Yu Y Q, Ma W M, Zeng Q G, et al. Molecular cloning and sexually dimorphic expression of two *Dmrt* genes in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Agricultural Research, 2014, 3(2): 181-191.
- [107] Abu Abayed F A, Manor R, Aflalo E D, et al. Screening for *Dmrt* genes from embryo to mature *Macrobrachium rosenbergii* prawns[J]. General and Comparative Endocrinology, 2019, 282: 113205.
- [108] Qian H L, Ma K Y, Feng J B, et al. Transcriptome analysis of the post-larvae of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) after *IAG* gene knockdown with microRNA interference[J]. General and Comparative Endocrinology, 2022, 325: 114054.
- [109] Sun R. Analysis of mRNA/miRNA expression profiles of male *Procambarus clarkii* after siRNA silencing *IAG*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2021. [孙榕. siRNA 干扰 *IAG* 后雄性克氏原螯虾 mRNA/miRNA 表达谱的分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2021.]
- [110] Sharabi O, Manor R, Weil S, et al. Identification and characterization of an insulin-like receptor involved in crustacean reproduction[J]. Endocrinology, 2016, 157(2): 928-941.
- [111] Tan K, Li Y H, Zhou M, et al. siRNA knockdown of *MrIR* induces sex reversal in *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Aquaculture, 2020, 523: 735172.
- [112] Yang G, Lu Z J, Qin Z D, et al. Insight into the regulatory

- relationships between the insulin-like androgenic gland hormone gene and the insulin-like androgenic gland hormone-binding protein gene in giant freshwater prawns (*Macrobrachium rosenbergii*)[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(12): 4207.
- [113] Li F J, Bai H K, Xiong Y W, et al. Molecular characterization of insulin-like androgenic gland hormone-binding protein gene from the oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* and investigation of its transcriptional relationship with the insulin-like androgenic gland hormone gene[J]. General and Comparative Endocrinology, 2015, 216: 152-160.
- [114] Song K, Xu T S, Zang Y N, et al. Insulin-like androgenic gland hormone gene in the freshwater Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*: cDNA cloning, expression pattern, and interaction with EsIGFBP7[J]. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 2018, 18(1): 17-25.
- [115] Guo Q, Li S H, Lv X J, et al. A putative insulin-like androgenic gland hormone receptor gene specifically expressed in male Chinese shrimp[J]. Endocrinology, 2018, 159(5): 2173-2185.
- [116] Chen Y L, Wang Y M, Xu H J, et al. The characterization and knockdown of a male gonad-specific insulin-like receptor gene in the white shrimp *Penaeus vannamei*[J]. Aquaculture Reports, 2022, 27: 101345.
- [117] Raymond C S, Shamu C E, Shen M M, et al. Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes[J]. Nature, 1998, 391(6668): 691-695.
- [118] Chandler J C, Elizur A, Ventura T. The decapod researcher's guide to the galaxy of sex determination[J]. Hydrobiologia, 2018, 825(1): 61-80.
- [119] Burtis K C, Coschigano K T, Baker B S, et al. The doublesex proteins of *Drosophila melanogaster* bind directly to a sex-specific yolk protein gene enhancer[J]. The EMBO Journal, 1991, 10(9): 2577-2582.
- [120] Zhang E F, Qiu G F. A novel *Dmrt* gene is specifically expressed in the testis of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. Development Genes and Evolution, 2010, 220(5-6): 151-159.
- [121] Chandler J C, Fitzgibbon Q P, Smith G, et al. Y-linked *iDmrt1* paralogue (*iDMY*) in the Eastern spiny lobster, *Sagmariasus verreauxi*: The first invertebrate sex-linked *Dmrt*[J]. Developmental Biology, 2017, 430(2): 337-345.
- [122] Wang Y B, Jin S B, Fu H T, et al. Identification and characterization of the *DMRT11E* gene in the oriental river prawn *Macrobrachium nipponense*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(7): Article No.1734.
- [123] Wan H F, Zhong J Y, Zhang Z P, et al. Discovery of the *Dmrt* gene family members based on transcriptome analysis in mud crab *Scylla paramamosain*[J]. Gene, 2021, 784: 145576.
- [124] Zhong J Y, Wan H F, Zhang Z P, et al. Cloning, expression, and function of the *Spdmrt-like* gene in *Scylla paramamosain*[J]. Molecular Biology Reports, 2022, 49(7): 6483-6493.
- [125] Wan H F, Zhong J Y, Zhang Z P, et al. Identification and functional analysis of the *doublesex* gene in the mud crab *Scylla paramamosain*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2022, 266: 111150.
- [126] Peng B H, Wan H F, Zhang Z P, et al. A novel *Dmrt* gene of crustacean: Functional analysis of *idmrt-2* gene in the male reproductive system from *Scylla paramamosain*[J]. Gene, 2023, 850: 146922.
- [127] Tan K, Zhou M, Jiang H G, et al. siRNA-mediated *MrIAG* silencing induces sex reversal in *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Marine Biotechnology, 2020, 22(3): 456-466.
- [128] Hodgkin J, Doniach T, Shen M. The sex determination pathway in the nematode *Caenorhabditis elegans*: Variations on a theme[J]. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 1985, 50: 585-593.
- [129] Doniach T, Hodgkin J. A sex-determining gene, *fem-1*, required for both male and hermaphrodite development in *Caenorhabditis elegans*[J]. Developmental Biology, 1984, 106(1): 223-235.
- [130] Mehra A, Gaudet J, Heck L, et al. Negative regulation of male development in *Caenorhabditis elegans* by a protein-protein interaction between *TRA-2A* and *FEM-3*[J]. Genes & Development, 1999, 13(11): 1453-1463.
- [131] Ventura-Holman T, Lu D Y, Si X H, et al. The *Fem1c* genes: Conserved members of the *Fem1* gene family in vertebrates[J]. Gene, 2003, 314: 133-139.
- [132] Song C W, Cui Z X, Hui M, et al. Molecular characterization and expression profile of three *Fem-1* genes in *Eriocheir sinensis* provide a new insight into crab sex-determining mechanism[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2015, 189: 6-14.
- [133] Ma K Y, Liu Z Q, Lin J Y, et al. Molecular characterization of a novel ovary-specific gene *fem-1* homolog from the oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense*[J]. Gene, 2016, 575(2): 244-252.
- [134] Galindo-Torres P, Ventura-López C, Llera-Herrera R, et al. A natural antisense transcript of the *fem-1* gene was found expressed in female gonads during the characterization, expression profile, and cellular localization of the *fem-1* gene

- in Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*[J]. Gene, 2019, 706: 19-31.
- [135] Zhou L X, Liu X, Ye B Q, et al. Molecular characterization of ovary-specific gene *Mrfem-1* and siRNA-mediated regulation on targeting *Mrfem-1* in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Gene, 2020, 754: 144891.
- [136] Zhu D D, Feng T Y, Mo N, et al. *Eriocheir sinensis* feminization-1c (*Fem-1c*) and its predicted miRNAs involved in sexual development and regulation[J]. Animals, 2023, 13(11): Article No.1813.
- [137] Yu Y, Wang Y, Lv X J, et al. Sex biased expression of *Fem-1* in larval stages suggests its function in early sex differentiation of *Litopenaeus vannamei*[J]. Reproduction and Breeding, 2023, 3(4): 153-160.
- [138] Wei J, Hong K H, Zhou Q Y, et al. Transcriptome analysis of gonads and brain of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*): Screening and validation of genes related to germ cell development[J]. Frontiers in Marine Science, 2022, 9: 1060594.
- [139] Zheng J B, Chen L R, Jia Y Y, et al. Genomic structure, expression, and functional characterization of the *Fem-1* gene family in the redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus*[J]. General and Comparative Endocrinology, 2022, 316: 113961.
- [140] Zheng J B, Chen L R, Jia Y Y, et al. Genomic structure, expression, and functional characterization of the *Fem-1* gene family in the redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus*[J]. General and Comparative Endocrinology, 2022, 316: 113961.
- [141] Song C W, Cui Z X, Hui M, et al. Molecular characterization and expression profile of three *Fem-1* genes in *Eriocheir sinensis* provide a new insight into crab sex-determining mechanism[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2015, 189: 6-14.
- [142] Zhu D D, Feng T Y, Mo N, et al. *Eriocheir sinensis* feminization-1c (*Fem-1c*) and its predicted miRNAs involved in sexual development and regulation[J]. Animals, 2023, 13(11): Article No.1813.
- [143] Zhu D D, Feng T Y, Mo N, et al. New insights for the regulatory feedback loop between type 1 crustacean female sex hormone (*CFSH-1*) and insulin-like androgenic gland hormone (*IAG*) in the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)[J]. Frontiers in Physiology, 2022, 13: 1054773.
- [144] Liu A, Liu J, Liu F, et al. Crustacean female sex hormone from the mud crab *Scylla paramamosain* is highly expressed in prepubertal males and inhibits the development of androgenic gland[J]. Frontiers in Physiology, 2018, 9: 924.
- [145] Jiang Q L, Lu B, Wang G Z, et al. Transcriptional inhibition of *Sp-IAG* by crustacean female sex hormone in the mud crab, *Scylla paramamosain*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(15): 5300.
- [146] Liu F, Huang L, Liu A, et al. Identification of a putative CFSH receptor inhibiting *IAG* expression in crabs[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(15): 12240.
- [147] Wang M E, Xu R, Tu S S, et al. Putative role of CFSH in the eyestalk-AG-testicular endocrine axis of the swimming crab *Portunus trituberculatus*[J]. Animals, 2023, 13(4): 690.
- [148] Liu F, Shi W Y, Ye H H, et al. RNAi reveals role of insulin-like androgenic gland hormone 2 (*IAG2*) in sexual differentiation and growth in hermaphrodite shrimp[J]. Frontiers in Marine Science, 2021, 8: 666763.
- [149] Cocquet J, De Baere E, Gareil M, et al. Structure, evolution and expression of the FOXL2 transcription unit[J]. Cytogenetic and Genome Research, 2003, 101(3-4): 206-211.
- [150] Cocquet J, Pailhoux E, Jaubert F, et al. Evolution and expression of FOXL2[J]. Journal of Medical Genetics, 2002, 39(12): 916-921.
- [151] Boulanger L, Pannetier M, Gall L, et al. FOXL2 is a female sex-determining gene in the goat[J]. Current Biology, 2014, 24(4): 404-408.
- [152] Zhang X B, Li M R, Ma H, et al. Mutation of *foxl2* or *cyp19a1a* results in female to male sex reversal in XX Nile Tilapia[J]. Endocrinology, 2017, 158(8): 2634-2647.
- [153] Yang Y J, Wang Y, Li Z, et al. Sequential, divergent, and cooperative requirements of *Foxl2a* and *Foxl2b* in ovary development and maintenance of zebrafish[J]. Genetics, 2017, 205(4): 1551-1572.
- [154] Jin S B, Fu H T, Jiang S F, et al. Molecular cloning, expression, and in situ hybridization analysis of forkhead box protein L2 during development in *Macrobrachium nipponense*[J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2018, 49(2): 429-440.
- [155] Zhu Y K, Chen H L, Zhang Q F, et al. Molecular cloning and expression patterns of a sex-biased transcriptional factor *Foxl2* in the giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*)[J]. Molecular Biology Reports, 2023, 50(4): 3581-3591.
- [156] Li Q, Xie J, He L, et al. FOXL2 down-regulates vitellogenin expression at mature stage in *Eriocheir sinensis*[J]. Bioscience Reports, 2015, 35(6): e00278.
- [157] Zhang M Q, Zhang J Y, Ge H X, et al. Preliminary functional study of *foxl2* in *Portunus trituberculatus* and analysis of its related miRNA[J]. Haiyang Xuebao, 2022,

- 44(4): 85-94. [张梦倩, 张景琰, 葛红星, 等. 三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*)*foxl2* 基因功能初探及相关 miRNA 分析[J]. 海洋学报, 2022, 44(4): 85-94.]
- [158] Wan H F, Zhong J Y, Zhang Z P, et al. Characterization of the *foxl2* gene involved in the vtg expression in mud crab (*Scylla paramamosain*)[J]. Gene, 2021, 798: 145807.
- [159] Wan H F, Zhong J Y, Zhang Z P, et al. Comparative transcriptome reveals the potential modulation mechanisms of *Spfoxl-2* affecting ovarian development of *Scylla paramamosain*[J]. Marine Biotechnology, 2022, 24(1): 125-135.
- [160] Sheng Y Z, Wan H F, Zhang Z P, et al. A new insight into potential roles of *Spfoxl-2* in the testicular development of *Scylla paramamosain* by RNAi and transcriptome analysis[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2023, 280: 111410.
- [161] Sheng Y Z, Wan H F, Zhang Z P, et al. A new insight into potential roles of *Spfoxl-2* in the testicular development of *Scylla paramamosain* by RNAi and transcriptome analysis[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2023, 280: 111410.
- [162] Katsuma S, Shoji K, Sugano Y, et al. Masc-induced dosage compensation in silkworm cultured cells[J]. FEBS Open Bio, 2019, 9(9): 1573-1579.
- [163] Li D R, Ye H L, Yang J S, et al. Identification and characterization of a *Masculinizer* (*Masc*) gene involved in sex differentiation in *Artemia*[J]. Gene, 2017, 614: 56-64.
- [164] Luo J Y, Shen S Q, Xu H J, et al. The transcription factor masculinizer in sexual differentiation and achieved full functional sex reversal in prawn[J]. iScience, 2023, 26(7): 106968.
- [165] Zhao D S, Yao C J, Zhang Z P, et al. Expression and functional analysis of *DDX5* gene in *Scylla paramamosain*[J/OL]. Journal of Applied Oceanography, 2023: 1-15. (2023-06-20). <https://kns.cnki.net/kcms2/detail/35.1319.P.20230620.1017.002.html>. [赵逗装, 姚成杰, 张子平, 等. 拟穴青蟹 *DDX5* 基因的表达及功能初步分析[J/OL]. 应用海洋学学报, 2023: 1-15. (2023-06-20)]. <https://kns.cnki.net/kcms2/detail/35.1319.P.20230620.1017.002.html>.]
- [166] Aktas M, Genc M A. The effects of 17 β -estradiol on growth, survival and feminization of green tiger shrimp, *P. semisulcatus* (Decapoda: Penaeidae)[J]. Journal of Animal and Veterinary Advances, 2011, 10(5): 562-565.
- [167] Harlioğlu M M, Yonar M E, Harlioğlu A G, et al. Effects of different methods and times of 17 β -estradiol treatment on the feminization success in the narrow-clawed crayfish *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823)[J]. Invertebrate Reproduction & Development, 2017, 61(4): 245-252.
- [168] Baghel D S, Lakra W S, Satyanarayana Rao G P. Altered sex ratio in giant fresh water prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) using hormone bioencapsulated live *Artemia* feed[J]. Aquaculture Research, 2004, 35(10): 943-947.
- [169] Cai P F, Yuan H W, Gao Z J, et al. 17 β -estradiol induced sex reversal and gonadal transcriptome analysis in the oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*): Mechanisms, pathways, and potential harm[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(10): Article No.8481.
- [170] Cai P F, Yuan H W, Gao Z J, et al. Sex reversal induced by dietary supplementation with 17 α -methyltestosterone during the critical period of sex differentiation in oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*)[J]. Animals, 2023, 13(8): Article No.1369.
- [171] Jin S B, Yue D, Fu H T, et al. Effects of dietary supplementation with 17 β -estradiol and 17 α -methyltestosterone on growth performance and gonadal development of the juvenile oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*)[J]. Aquaculture Reports, 2022, 23: 101042.
- [172] Carman O, Jamal M Y, Alimuddin. Oral administration of 17 α -methyltestosterone increased male percentage of freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus*[J]. Journal Akuakultur Indonesia, 2008, 7(1): 25-32.
- [173] Susanto G N, Sutyarso S, Supono S, et al. The effectiveness of using steroid extract of sea cucumber for sex reversal in juvenile redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*)[C]// Proceedings of the 5th International Conference on Biological Sciences (ICBS). 出版地: 出版者, 2017: 15-16.
- [174] Susanto G N, Sutyarso, Widiyanto W. Monosex male formation of juvenile redclaw crayfish using natural steroid hormone from gamma sea cucumber and different doses of honey bee[J]. Journal of Physics: Conference Series, 2021, 1751(1): 012050.
- [175] Susanto G N, Widiastuti E L, Rustanti T, et al. Immersion in sea cucumber's steroid extract to increase male production of juvenile freshwater crayfish[J]. Fisheries and Aquatic Sciences, 2023, 26(1): 48-57.
- [176] Sellars M J, Li F, Preston N P, et al. Penaeid shrimp polyploidy: Global status and future direction[J]. Aquaculture, 2010, 310(1-2): 1-7.
- [177] Li F H, Xiang J H, Zhang X J, et al. Gonad development characteristics and sex ratio in triploid Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*)[J]. Marine Biotechnology, 2003, 5(6): 528-535.
- [178] Coman F E, Sellars M J, Norris B J, et al. The effects of triploidy on *Penaeus (Marsupenaeus) japonicus* (Bate) survival, growth and gender when compared to diploid siblings[J]. Aquaculture, 2008, 276(1-4): 50-59.
- [179] Sellars M J, Wood A T, Dixon T J, et al. A comparison of

- heterozygosity, sex ratio and production traits in two classes of triploid *Penaeus (Marsupenaeus) japonicus* (Kuruma shrimp): Polar Body I vs II triploids[J]. *Aquaculture*, 2009, 296(3-4): 207-212.
- [180] Zhang C S. Polyploid induction and sex control in several economically important crustacean species[D]. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2009. [张成松. 重要水产养殖虾蟹类的多倍体诱导及性别控制研究[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2009.]
- [181] Jiang X H, Qiu G F. Female-only sex-linked amplified fragment length polymorphism markers support ZW/ZZ sex determination in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*[J]. *Animal Genetics*, 2013, 44(6): 782-785.
- [182] Ventura T, Aflalo E D, Weil S, et al. Isolation and characterization of a female-specific DNA marker in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*[J]. *Heredity*, 2011, 107(5): 456-461.
- [183] Amir S, Tomer V. Insulin-like gene in prawns and uses thereof: CN101981046B[P]. 2015-01-07. [埃米尔·萨奇, 托马·文图拉. 对虾中的胰岛素样基因和其用途: CN101981046B[P]. 2015-01-07.]
- [184] Rotem-Dai N, Weil S, Greenshpan Y, et al. Lentiviral-transduced ectopic expression of androgenic hormone in a crustacean hematopoietic primary cell culture[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2021, 8: Article No.677679.
- [185] Abo-Al-Ela H G. RNA interference in aquaculture: A small tool for big potential[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(15): 4343-4355.
- [186] Lezer Y, Aflalo E D, Manor R, et al. On the safety of RNAi usage in aquaculture: The case of all-male prawn stocks generated through manipulation of the insulin-like androgenic gland hormone[J]. *Aquaculture*, 2015, 435: 157-166.
- [187] Li F J, Fu C P, Li M S, et al. Research progress of RNA interference in crustaceans[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2017, 41(2): 460-472. [李法君, 付春鹏, 李明爽, 等. RNAi 在甲壳动物中的研究进展[J]. *水生生物学报*, 2017, 41(2): 460-472.]
- [188] Thammasorn T, Sangsuriya P, Meemetta W, et al. Large-scale production and antiviral efficacy of multi-target double-stranded RNA for the prevention of white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp[J]. *BMC Biotechnology*, 2015, 15: Article No.110.
- [189] Prates L H F, Merlau M, Rühl-Teichner J, et al. An optimized/scale up-ready protocol for extraction of bacterially produced dsRNA at good yield and low costs[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(11): 9266.
- [190] Charoonnart P, Taunt H N, Yang L Y, et al. Transgenic microalgae expressing double-stranded RNA as potential feed supplements for controlling white spot syndrome in shrimp aquaculture[J]. *Microorganisms*, 2023, 11(8): 1893.
- [191] Lv J J, Sun D F, Huan P P, et al. QTL mapping and marker identification for sex-determining: Indicating XY sex determination system in the swimming crab (*Portunus trituberculatus*)[J]. *Frontiers in Genetics*, 2018, 9: 337.
- [192] Lu J K, Li R H, Bekaert M, et al. Development and validation of SNP genotyping assays to identify genetic sex in the swimming crab *Portunus trituberculatus*[J]. *Aquaculture Reports*, 2021, 20: 100731.
- [193] Li R H, Bekaert M, Lu J K, et al. Mapping and validation of sex-linked SNP markers in the swimming crab *Portunus trituberculatus*[J]. *Aquaculture*, 2020, 524: 735228.
- [194] Fang S B, Zhang Y, Shi X, et al. Identification of male-specific SNP markers and development of PCR-based genetic sex identification technique in crucifix crab (*Charybdis feriatus*) with implication of an XX/XY sex determination system[J]. *Genomics*, 2020, 112(1): 404-411.
- [195] Shi X, Waiho K, Li X C, et al. Female-specific SNP markers provide insights into a WZ/ZZ sex determination system for mud crabs *Scylla paramamosain*, *S. tranquebarica* and *S. serrata* with a rapid method for genetic sex identification[J]. *BMC Genomics*, 2018, 19(1): Article No.981.
- [196] Waiho K, Shi X, Fazhan H, et al. High-density genetic linkage maps provide novel insights into ZW/ZZ sex determination system and growth performance in mud crab (*Scylla paramamosain*)[J]. *Frontiers in Genetics*, 2019, 10: 298.
- [197] Jin L, Jia S T, Zhang W, et al. Identification of sex-specific DNA markers: Providing molecular evidence for the ZW sex determination system in the redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*)[J]. *Aquaculture*, 2022, 546: 737254.
- [198] Cui Z, Hui M, Liu Y, et al. High-density linkage mapping aided by transcriptomics documents ZW sex determination system in the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*[J]. *Heredity*, 2015, 115(3): 206-215.
- [199] Liu B H, Zhang Y Q, Ma K Y, et al. Identification of sex-specific markers and ZW-chromosome DNA clones from the genomic BAC library of the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*[J]. *Aquaculture*, 2022, 560: 738576.
- [200] Gui T S, Zhang J Q, Song F G, et al. CRISPR/Cas9-mediated genome editing and mutagenesis of *EcChi4* in *Exopalaemon carinicauda*[J]. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 2016, 6(11): 3757-3764.
- [201] Song F G. Functional analysis of *Exopalaemon carinicauda* molt inhibiting hormone through targeted gene knockout using CRISPR/Cas9 genome editing tool[J]. Qingdao:

Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2017.
[宋凤阁. CRISPR/Cas9 技术对脊尾白虾蜕皮抑制激素基因的靶向敲除研究[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2017.]

[202] Gao Y, Zhang X J, Yuan J B, et al. CRISPR/Cas9-mediated mutation on an insulin-like peptide encoding gene affects the growth of the ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda*[J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2022, 13: 986491.

Research progress on sex control and monosex culture of decapod crustaceans

CHEN Shihai^{1,4}, JIN Yaqi², ZHANG Ziping³, WANG Yilei¹

1. State Key Laboratory of Mariculture Breeding, Fisheries College of Jimei University, Xiamen 361021, China;
2. College of Animal Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;
3. Key Laboratory of Marine Biotechnology of Fujian Province; College of Marine Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;
4. Guangdong Yuzeyuan Biotechnology Co., Ltd., Zhuhai 519000, China

Abstract: The molecular mechanisms of sex determination and differentiation encompass multiple levels, including sex chromosomes, pivotal factors regulating sex determination and differentiation, epigenetic modifications, and gene regulatory networks. In addition, decapod crustaceans exhibit diverse sex-determination systems and differentiation pathways, the majority of which exhibit sexual dimorphism in growth patterns or economic traits. Increasing demand for decapod crustaceans has led to advancements in aquatic seedling production, aquaculture management, and technology. Therefore, the demand for monosexual decapod crustacean populations has increased. In the study of sex control in decapod crustaceans, various methods have been used to establish highly monosex populations, focusing on triploid induction, treatment with exogenous sex hormones or chemical substances, ablation and transplantation of androgenic glands, and RNA interference (RNAi) of genes. Moreover, in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*, there have been successful studies of sex control and its application in the production of all-male populations using sex molecular markers and RNAi technology for targeting genes such as *IAG*, *dmrt11E*, and *masc*. These studies on sex control, based on the molecular mechanisms of sex determination and differentiation in decapod crustaceans, are expected to bring about novel breakthroughs in the production of monosex seedlings and aquaculture. Herein, we reviewed the research progress on the molecular regulation mechanisms of sex determination and differentiation in decapod crustaceans, discussed important endocrine organs, including the eye stalk and androgenic gland, and key sex-related genes containing *IAG*, *dmrt* gene families, *fem-1*, *CFSH*, *foxl2* and *masc*. Furthermore, we discussed monosexual control strategies such as RNAi technology and sex hormone induction in decapod crustaceans, as well as the development and identification of sex-specific molecular markers, aiming at laying the theoretical foundations for the large-scale production of monosex aquatic seedlings and aquaculture in decapod crustaceans.

Key words: crustaceans; sex control; monosex culture

Corresponding author: WANG Yilei. E-mail: ylwang@jmu.edu.cn