DOI: 10.12264/JFSC2021-0359

## 1种快速鉴定金钱鱼遗传性别的方法

黄洋,黄远青,邓秋敏, MUSTAPHA Umar Farouk, 彭友幸,李广丽,江东能 广东海洋大学水产学院,广东省名特优鱼类生殖调控与繁育工程技术研究中心,广东 湛江 524088

摘要:金钱鱼(Scatophagus argus)是我国东南沿海名优养殖鱼类,具有 XY 性别决定系统,Dmrt1 是其性别决定候选基因。金钱鱼生长具有性别二态性,雌鱼生长快于雄鱼。目前缺乏快速鉴定金钱鱼遗传性别的分子标记,阻碍了其性别控制育种技术的建立。本研究以公布的金钱鱼基因组数据,在 Dmrt1 附近设计多对标记引物,并通过 PCR 扩增验证标记的性别特异性。其中,标记引物 Dmrt1-Marker-4-F/R 在雌鱼中仅扩增出一条 593 bp X 染色体条带,而在雄鱼中能扩增出 593 bp 和 693 bp 两条条带,分别来自 X 和 Y 染色体,表明该标记为共显性标记。利用该标记检测我国南海沿岸 3 个不同地理群体 213 尾金钱鱼的遗传性别与表型性别完全一致。此外,快速 DNA 提取试剂盒提取的片段较短 DNA 样品也可用于该对标记引物准确鉴定遗传性别。本研究建立了一种快速、准确、经济可靠的金钱鱼遗传性别鉴定方法,将旨为促进金钱鱼性别控制育种技术的建立,并为金钱鱼性别决定与分化机制研究提供依据。

**关键词:**金钱鱼;性别鉴定;分子标记;二代测序 中图分类号: S941 **文献标志码:** A

文章编号:1005-8737-(2022)04-0515-10

许多鱼类具有性别二态性以及生长速度和体型的性别二态性<sup>[1]</sup>。由于单性养殖可提高效益,因此性别控制育种技术在水产养殖中应用潜力巨大,如日本牙鲆(Paralichthys olivaceus)<sup>[2]</sup>、半滑舌鳎(Cynoglossus semilaevis)<sup>[3]</sup>、南方大口鲇(Silurus meridionalis)<sup>[4]</sup>和鳜(Siniperca chuatsi)<sup>[5]</sup>等鱼类雌性比雄性生长快,全雌化养殖有助于提高其养殖产量;相反,黄颡鱼(Pelteobagrus fulvidraco)<sup>[6]</sup>、尼罗罗非鱼(Oreochromis niloticus)<sup>[7]</sup>、斑鳢(Channa argus)<sup>[8]</sup>和兰州鲇(Silurus lanzhouensis)<sup>[9]</sup>等,雄鱼比雌鱼生长快,全雄化养殖可提高效益。目前已在部分养殖鱼类实现了单性苗种培育,并显著提高了养殖效益,性别控制育种能促进水产养殖的发展。

金钱鱼(Scatophagus argus)俗名金鼓,隶属鲈 形目(Perciformes)、刺尾鱼亚目(Acanthuroidei)、 金钱鱼科(Scatophagidae)、金钱鱼属。金钱鱼是一 种中小型鱼类,最大个体体重可达 1 kg。金钱鱼 广泛分布在印度-太平洋水域,在我国主要分布于 东南沿海,市场价格高,属于名贵鱼类<sup>[10-11]</sup>。金钱 鱼具有较强的环境适应能力和抗逆性,养殖成本 低,可单养也可混养,具有广阔的市场需求<sup>[12-14]</sup>。 据不完全统计,目前金钱鱼在我国广东、广西和 台湾等地的养殖总产值每年可达 1.5 亿元(人民 币)<sup>[15]</sup>。近年来,养殖规模逐渐扩大,而野生资源 日益匮乏,金钱鱼优质苗种需求与日俱增。

金钱鱼性成熟周期较短,具有明显雌雄生长 差异,野生条件下雄鱼最快1龄性成熟,雌鱼一 般2龄性成熟。鉴于金钱鱼的经济价值,国内外 围绕其繁殖生物学开展了大量研究,其人工繁殖 技术已成功<sup>[11,15-23]</sup>。但目前金钱鱼遗传育种进展 相对缓慢,鲜有报道。金钱鱼人工养殖条件下,1 龄雌鱼体重比雄鱼高30%左右,2龄雌鱼体重则高

收稿日期: 2021-08-16; 修订日期: 2021-08-31.

基金项目:国家自然科学基金项目(31702326);广东省自然科学基金项目(2019A1515012042; 2021A1515010430).

作者简介: 黄洋(1981-), 男, 硕士, 高级工程师, 主要从事海产动物增养殖研究. E-mail: zjouhy@126.com

并列第一作者: 黄远青. E-mail: 1178163049@qq.com

通信作者: 江东能, 副教授, 博士, 主要从事水产动物繁殖生物学研究. E-mail: dnjiang@gdou.edu.cn

于雄鱼 100%以上<sup>[16]</sup>、全雌化养殖可明显提高养 殖效率,但尚未见金钱鱼全雌苗种培育报道。鱼 类性别具有可塑性, 以 XY 性别决定系统鱼类为 例,可诱导 XX 个体逆转为伪雄鱼,将 XX 伪雄鱼 与正常 XX 雌鱼交配可获得全雌后代; 另一方面, 可诱导 XY 个体逆转为伪雌鱼,将 XY 伪雌鱼与 XY正常雄鱼交配,获得YY超雄鱼,YY超雄鱼与 正常 XX 雌鱼交配可获得全雄后代<sup>[1]</sup>。遗传性别 快速鉴定是鱼类性别控制育种关键技术之一。传 统鱼类性别控制育种通过测交等手段来判断亲本 基因型,耗时耗力,而基于性别特异或连锁的分子 标记,可快速准确地鉴定遗传性别,省时省力<sup>[1]</sup>。 2018 年 Mustapha 等<sup>[24]</sup>报道了两对金钱鱼性别特 异的分子标记, 证明金钱鱼具有 XX-XY 性别决 定系统。其中一对标记是位于 Dmrt3 基因 SNP 标 记, 需通过 Sanger 测序基因分型, 测序成本高且 耗时;另一对标记仅能扩增Y染色体 Dmrt1 基因 特异序列, Dmrt1 在雌鱼不存在, 所以该标记为非 共显性标记,不能有效区分 XY 和 YY 个体(Dmrt1-Marker-1)(图 1)<sup>[24]</sup>。本研究基于金钱鱼雌雄基因 组数据,比较性别决定候选基因 Dmrt1 与其等位 基因 Dmrt1b 序列, 根据以往的研究结果<sup>[25-27]</sup>, 通 过进行二者的序列差异设计、筛选性别特异引物, 以建立1种快速鉴定金钱鱼遗传性别的方法,旨 在为金钱鱼性别控制育种提供可靠的性别标记。

#### 1 材料与方法

#### 1.1 实验样本采集

本实验所用金钱鱼养殖于广东海洋大学海洋 生物研究基地。另从我国南海沿岸(广西北海,广 东湛江、珠海)购买 213 尾野生金钱鱼成鱼(体重 150~300 g),用于检验性别特异性引物的通用性。

#### 1.2 金钱鱼生理性别鉴定

采用 100 mg/L 的 MS-222 麻醉金钱鱼后立即 解剖。剪取部分性腺置于波恩氏液中,室温固定 24 h,石蜡包埋,切片厚度 5 μm,苏木精-伊红染 色,光学显微镜(Nikon,日本)拍照,鉴定金钱鱼 表型性别。

#### 1.3 基因组 DNA 提取

剪取金钱鱼部分尾鳍,采用柱式法提取高纯

度基因组 DNA (N1173, 东盛生物科技有限公司, 中国),按照试剂盒说明书操作,将基因组 DNA 浓度调整至 50 ng/µL 用于 PCR 扩增。该试剂盒蛋 白酶K 消化 3 h左右,再加上分离纯化等操作,约 需 5 h 完成。但该试剂盒提取的 DNA 纯度高,片 段长,易于 PCR 扩增。无特殊说明,本研究使用 的 DNA 样品由此试剂盒提取。此外,还采用斑马 鱼(*Danio rerio*)直接 PCR 试剂盒(TP-0141T,成都 福际生物技术有限公司,中国)快速提取基因组 DNA。首先,剪取 10 mg 左右金钱鱼尾鳍,剪碎 后,加入 100 µL 裂解液和 4 µL 蛋白酶 K,65 ℃孵 育 10~30 min,然后 95 ℃ 5 min 变性蛋白酶 K, 离心 5 min,取上清即可进行 PCR 扩增。该试剂 盒操作简便快捷,30~60 min 可完成提取,但提取 的 DNA 片段较短,小于 1000 bp。

#### 1.4 性别特异引物设计

基于雌雄金钱鱼基因组序列比较分析, 表明 Dmrt1 只存在于雄鱼中, 是金钱鱼性别决定候选 基因, 其等位基因 Dmrt1b 存在于雌雄鱼, 可根据 二者的序列差异,开发性别特异分子标记<sup>[24-25]</sup>。 Dmrt1b 位于 4 号染色体(X 染色体) 25.3 Mb 附近, 目前尚未测定 Y 染色体全序列, Dmrt1 在 Y 染色 体位置尚不清楚<sup>[26]</sup>。Dmrt1 外显子 1~4 与相应的 Dmrt1b 同源序列相似度分别为 79.9%、90.7%、 75.8%和 84.1%, Dmt1b 不存在 Dmrt1 外显子 5 的 同源序列<sup>[25]</sup>。通过本地 Blast (NCBI-blast-2.2.27)、 从金钱鱼基因组中获取 Dmrt1 和 Dmrt1b 基因序列, 然后利用 DNASTAR 软件(http://www.dnastar.com) MegAlign 程序进行序列多重比对,根据比对结果, 利用 Premier 6 软件设计 3 对新的标记引物 (Dmrt1-Marker-2-F2/R2 Dmrt1-Marker-3-F3/R3 和 Dmrt1-Marker-4-F4/R4) (表 1, 图 1), 引物由上 海生工生物工程公司合成。

#### 1.5 性别特异引物的 PCR 及测序验证

采用 3 雌 3 雄金钱鱼验证新设计的性别特异 引物。用 2×PCR MIX (P2011, 广州东盛生物科技 有限公司, 中国)进行 PCR 扩增。PCR 反应程序: 94 ℃变性 3 min; 94 ℃ 30 s, 60 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 37 个循环; 最后 72 ℃ 扩增 10 min。 PCR

東炊	定	仝	鈻	伯	蛊	传

基因 gene	e	引物 primer 序列 sequence				片段大小 fragment size					
Dmrt3	Dmr	t3-Marker-F		ACGAGAGCCTGGAGAGCCTCAT				X and Y: ~543			
	Dmr	t3-Marker-R		TGCGC	GCACCA	CTGTGT	ſAACTG	A			
Dmrt1	1 Dmrt1-Marker-1-F1		GAAG	GCAGC	AAGATC	AGGAG	GA			X: 0 bp	
	Dmrt1-Marker-1-R1			CAGCA	AGCAG	GTCAGA	TGGTTC	CC		Y: 3081 bp	
Dmrt1	mrt1 Dmrt1-Marker-2-F2			AGGTTATACCTTTCTTTCAGCTAGGTTA				X: 0 bp			
	Dmrt1-Marker-2-R2			TGTATTCCCTGTTTCACACCAC					Y: 1064 bp	Y: 1064 bp	
Dmrt1	Dmr	t1-Marker-3-F3	Marker-3-F3 GCAGCTACACACAGGTTTTC					X: 1117 bp			
	Dmr	t1-Marker-3-R3 TGCGTGTCCTTGTTCATGGC					Y: 1003 bp				
Dmrt1	Dmrt1 Dmrt1-Marker-4-F4 TCAGAGCACAATTGTTAGGCAAAGTGAAC				AAC	X: 593 bp Y: 693 bp					
	Dmr	I-Marker-4-R4 TCGCTACTTTCACCAATACAGCATGA									
Dmrt1 -	标记3 marker-3 F3 F2	标记: ATG <sup>marker</sup> ↓ R3 E1	2 2 ₩ I1	F1 E2	标记1 arker-1 I2	R1 ← E3	// I3	E4	// I4	様 TGA <sup>ma</sup> F4 E5	床记4 rker-4 ————————————————————————————————————
Dmrt1b -		ATG	I1	TGA ↓ E2	// I2	– E3 –	I3	- E4			

表1 本研究所用到的引物 Tab. 1 Primers used in the present study

图 1 金钱鱼 Y 染色体和 X 染色体上 Dmrt1/Dmrt1b 基因结构示意图及 4 对性别特异标记的位置<sup>[25]</sup> Fig. 1 Schematic representation of the Dmrt1/Dmrt1b gene structures on the Y and X chromosomes of spotted scat (Scatophagus argus), showing the location of 4 pairs of sex-specific markers<sup>[25]</sup>

产物经 20 mg/mL 琼脂糖凝胶电泳检测, Tanon 2500R凝胶成像系统(天根,上海)拍照。PCR产物 纯化后与 pEASY-T3 载体(CT301-01, 北京全式金 生物技术有限公司,中国)连接,连接产物转化到 DH5α 大肠杆菌感受态细胞, 阳性克隆送上海生 工生物工程公司测序,序列采用 Lasergene v 7.1.0 软件比对分析。同时,采用以 Mustapha 等开发的 SNP 标记(Dmrt3-Marker)和 Dmrt1-Marker-1 检测 实验鱼的遗传性别<sup>[24]</sup>。Dmrt3-Marker 扩增产物送 上海生工生物工程公司测序,通过 SNP 鉴定遗传 性别。Dmrt1-Marker-1 扩增片段较长、与上述扩 增条件略有不同, 详见 Jiang 等<sup>[26]</sup>。

#### 1.6 不同地理群体金钱鱼遗传性别鉴定

为评估新开发的性别特异引物的准确性和通 用性, 选取 3 个不同地理群体的 213 尾金钱鱼进 行验证, PCR 方法同 1.5。213 尾实验鱼表型性别都 通过 HE 染色确认, 遗传性别通过 Mustapha 等<sup>[24]</sup> 开发的 SNP 标记(Dmrt3-Marker)鉴定。

#### 1.7 网箱养殖1龄金钱鱼雌雄生长比较

2019年7月人工繁殖一批金钱鱼鱼苗,经水 泥池培育过冬养至全长 5~7 cm, 2020 年 3 月转移 至广东省湛江市东南码头网箱养殖, 半年后随机 选择 400~500 尾, 记录体长和体重, 并剪取部分 尾鳍,取样之后正常养殖,不再切片鉴定表型性 别。采用斑马鱼直接 PCR 试剂盒提取鳍条基因组 DNA, 利用新的性别特异分子标记鉴定其遗传性 别。生长数据采用平均值±标准差 (means±SD)表 示,并采用 SPSS 18.0 进行独立样本 T 检验,显著 性水平为 P=0.05。

#### 2 结果与分析

#### 2.1 新性别特异标记筛选

用于筛选新性别特异标记的3雌3雄金钱鱼 表型性别由性腺组织学切片鉴定,遗传性别由 Mustapha 等<sup>[24]</sup>开发的 SNP标记和 Dmrt1-Marker-1 鉴定,结果表明 6 尾鱼表型性别与遗传性别吻合 (图 2, 图 3)。对新设计的 3 对位于 Dmrt1/Dmr1b 的性别特异标记引物进行验证,结果显示, Dmrt1-Marker-2 仅在 XY 个体扩增出单一条带,通过亚 克隆测序显示长度为1064 bp,为Y染色体特异片 段。Dmrt1-Marker-3 在 XX 个体扩增出单一条带, 为 1117 bp X 染色体片段,在 XY 个体扩增出两 条带,分别为1117 bp X 和 1003 bp Y 染色体片段 (图 3)。*Dmrt1*-Marker-4 在 XX 个体扩增出一条带, 长度为 593 bp,为 X 染色体特异片段,在 XY 个体 扩增出两条带,分别为 693 bp X 染色体和 593 bp Y 染色体片段(图 3)。*Dmrt1*-Marker-4 扩增的 X 染色 体特异序列相对于 Y 染色体序列有较多缺失(图 4)。



图 2 性腺组织学鉴定金钱鱼表型性别 Fig. 2 Phenotype sex identification of spotted scat (*Scatophagus argus*) by histological observation



 Fig. 3 Genetic sex identification of the of the spotted scat (*Scatophagus argus*) by sex-specific markers
 M: DNA Marker; ♀: Female; ♂: Male; -: negative control.

#### 2.2 金钱鱼新性别特异引物的稳定性和普适性 检测

*Dmrt1*-Marker-3 和-4 可同时区分 XX、XY 和 YY 个体,均为共显性标记,但 *Dmrt1*-Marker-3 扩 增的 X 和 Y 染色片段较长,大于 1000 bp,对基因 组 DNA 模板质量要求较高。Dmrt1-Marker-4 扩增 的 X 和 Y 染色片段较短,无需片段较长的基因组 模板,且较短时间电泳可鉴定遗传性别,更符合 快速鉴定金钱鱼遗传性别的要求。Dmrt1-Marker-4 标记鉴定 3 个不同地理群体金钱鱼的遗传性别, 结果显示,所有雌鱼中只扩增出 593 bp 的单一条 带,所有雄鱼扩增出 593/693 bp 的双条带(图 5)。同 时, Dmrt3-Marker 和 Dmrt1-Marker-4 鉴定结果一致 (表 2),两对标记鉴定的遗传性别与表型性别 100% 吻合,表明 Dmrt1-Marker-4 在不同群体中也具有稳 定性和通用性,可广泛用于金钱鱼遗传性别鉴定。

### 2.3 快速 DNA 提取试剂盒用于遗传性别鉴定

经典的柱式法提取 DNA 速度较快、质量好, 但提取相对费时费力。由于 Dmrt1-Marker-4 标记 扩增的片段小于1000 bp,如仅鉴定金钱鱼遗传性别, 无需大量纯度高、片段长的基因组 DNA 模板,可采 用快速 DNA 提取试剂盒提取少量非纯化的 DNA 模 板,从而节约时间和成本。Dmrt1-Marker-4 引物分别 扩增柱式法和斑马鱼直接 PCR 试剂盒法提取基因 组 DNA,二者扩增效果相似,均可很好地鉴定遗传 性别(图 6)。结果表明片段较短的基因组 DNA 模板 也可用于 Dmrt1-Marker-4 鉴定金钱鱼的遗传性别。



图 5 Dmrt1-Marker-4 检测 3 个不同群体金钱鱼遗传性别

M: DNA Marker; -: 阴性对照.

Fig. 5 Genetic sex identification of spotted scat (Scatophagus argus) from three populations

using specific primers for Dmrt1-Marker-4

M: DNA Marker; -: negative control.

定

Tab. 2	Genetic sex identification	of spotted	scat (Scatophagu	is argus) from 3	populations
				··· ·· · · · · · · · · · · · · · · · ·	

分子标记 molecular marker	北海 Beihai	湛江 Zhanjiang	珠海 Zhuhai
Dmrt3-Marker-F/Dmrt3-Marker-R	$39 \stackrel{\circ}{_+} (39 \stackrel{\circ}{_+} : 0 \stackrel{\scriptscriptstyle\wedge}{_{\scriptscriptstyle \circ}})$	30♀ (30♀ ∶0♂)	37♀ (37♀ ∶ 0♂)
	51♂ (0♀ : 51♂)	$14^{\land}_{\bigcirc} (0^{\bigcirc}_{+} : 14^{\land}_{\bigcirc})$	42♂ (0♀:42♂)
Dmrt1-Marker-4-F/Dmrt1-Marker-4-R	39♀ (39♀ ∶0♂)	30♀ (30♀ ∶ 0♂)	37♀ (37♀:0♂)
	51 ĉ ( 0♀ : 51♂)	14층 (0우 : 14층)	42♂ (0♀:42♂)
准确率/% accuracy	♀ <b>: 100</b>	$\bigcirc$ : 100	$\bigcirc$ : 100
	് : 100	് : 100	് : 100

#### 2.4 网箱养殖金钱鱼雌雄生长比较

采用斑马鱼直接 PCR 试剂盒提取基因组 DNA,并应用性别特异标记 Dmrt1-Marker-4 筛选 到了网箱养殖1龄的XX 雌鱼202 尾, XY 雄鱼255 尾,雌雄比例为0.79:1。XX 雌鱼体长9.2~15.1 cm, 平均 12.2 cm, 体重 51.8~180.5 g, 平均 107.8 g。 XY 雄鱼体长 8.7~13.1 cm, 平均 11.3 cm, 体重 30.8~156.6 g, 平均 84.7 g。XX 体长和体重都显著 高于 XY 个体(*P*<0.05), 其中 XX 平均体重比 XY 高 27.3%(图 7)。







不同小写字母表示雌雄鱼之间存在显著差异(P<0.05). 雌鱼 202 尾, 雄鱼 255 尾, x ±SD.</li>
 Fig. 7 Comparing of the growth performance of one year old spotted scat (*Scatophagus argus*) cultured in net cage Different lowercase letters indicate significant difference (P<0.05) among female and male fish.</li>
 Female 202 inds, and male 255 inds, x ±SD.

#### 3 讨论

鱼类生长是水产养殖关注的重要经济性状之 一。许多经济鱼类存在生长性别二态性现象,雌 雄间的生长速率和个体大小差异很大,因此生产 全雄或全雌苗种可显著提高养殖效益。遗传性别 控制育种技术是一种高效的性别控制手段。准确 鉴定遗传性别是遗传性别控制技术的重要基础之 一,性别特异或连锁的分子标记是遗传性别鉴定 的重要手段。本研究开发了金钱鱼性别特异的共 显性标记,且建立了通过 PCR 快速鉴定遗传性别 的方法,可为金钱鱼性别控制育种提供重要基础。

性别控制是水产养殖的重要技术,与之相关的性别决定与分化分子机制研究也是一个被普遍 关注的基础生物学问题<sup>[28-29]</sup>。鱼类性别决定与分 化研究是鱼类遗传学和育种学研究的热点。近年 来,鱼类性别特异分子标记的开发报道迅猛增加。早期鱼类性别特异分子标记的开发以传统的 RFLP、RAPD和AFLP和SSR等手段为主<sup>[1]</sup>。近年来,基因组测序技术广泛应用在水产动物性别 连锁分子标记开发中。如利用简化基因组测序,在 尼罗罗非鱼<sup>[30]</sup>、鳙(*Hypophthalmichthys nobilis*)<sup>[31]</sup>、 白鲢(*H. molitrix*)<sup>[31]</sup>和斑鳢<sup>[32]</sup>等鱼类中筛选到性 别连锁分子标记。简化基因组测序法无需参考基 因组,单样测序成本低,但一般需要样本数较多, 且最好能培育家系材料并构建连锁图谱定位性 别决定区间。利用全基因组重测序,在大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)<sup>[33]</sup>、南方大口鲇<sup>[4]</sup>、鳜<sup>[5]</sup>和 奧利亚罗非鱼(*O. aureus*)<sup>[34]</sup>中找到了性别连锁分 子标记。全基因组重测序法最好具有染色体水平 的基因组作为基础、测序成本与测序深度和样品

数相关, 重测序深度和样品数要根据分析策略调 整, 重测序不仅可开发性别特异标记, 还可研究 性染色体序列分化。基于高通量测序寻找性别分 子标记的方法在普适性和重复性方面有优势。性 别连锁的分子标记可为定位和鉴定性别决定基因 提供重要基础,同时性别决定基因也是最好的性 别特异分子标记。与哺乳类和鸟类不同, 鱼类的 性别决定基因多种多样<sup>[35]</sup>。在部分鱼类,性别决 定基因还具一定保守性,例如,5种青鳉属鱼类 (Oryzias)的性别决定基因都为 Dmy<sup>[36]</sup>。最近,发 现金鲳(Trachinotus ovatus)具有与同科的高体鰤 (Seriola dumerili)相同的性别决定区域,它们的性 别决定区域都包含 Hsd17b1 基因<sup>[37-38]</sup>。因此,利 用近缘种已知的性别决定基因或性别决定候选基 因开发性别特异分子标记是一种高效方法。此外, 直接验证性别决定与分化通路中关键基因是否与 性别连锁, 也是一种快速开发性别特异分子标记 高效策略。例如,在黄姑鱼(Nibea albiflora)中,研 究人员证实 Dmrt1 与雄性性别紧密连锁<sup>[39]</sup>。性腺 转录组数据也可提供性别决定与分化相关基因信 息,金钱鱼性别特异的分子标记就是基于性腺转 录组获得的 Dmrt3 和 Dmrt1 的异常转录本信息,从 而开发的性别特异分子标记<sup>[24,40]</sup>。随着测序技术和 生物信息学分析方法的发展,鱼类性别特异分子 标记的开发将更加便捷。

雄性特异 Dmrt1 是金钱鱼性别决定候选基因, 预期可在该基因区域开发性别特异分子标记。本 研究证实在 Dmrt1 基因区域可开发性别特异分子 标记,这些标记再次证实金钱鱼具有 XX/XY 性 别决定系统,与 Mustapha 等<sup>[24]</sup>结果一致。与 Mustapha 等<sup>[24]</sup>报道的 SNP标记相比,本研究开发 的性别特异标记不用 PCR 产物测序,最快可在 3 h 内完成金钱鱼遗传性别鉴定,可节约时间和成本 (图 8),该标记可为金钱鱼分子标记辅助育种提供



图 8 金钱鱼遗传性别快速鉴定流程

Fig. 8 Flow chat of rapid identification of genetic sex of spotted scat (Scatophagus argus)

技术支撑,也为金钱鱼性别决定基因功能、性染 色体进化等研究奠定基础。

最新研究表明雌激素处理能够诱导金钱鱼 XY 个体性别逆转为雌鱼, 但雄激素和芳香化酶 抑制却不能诱导 XX 个体逆转为雄鱼<sup>[41]</sup>。XX 个 体不能逆转,可能是由于 XX 个体缺乏 Dmrt1 导 致。在日本青鳉(O. Latipes)<sup>[42]</sup>、斑马鱼<sup>[43]</sup>和尼罗 罗非鱼<sup>[44]</sup>突变 Dmrt1 都会导致由雄向雌的性别逆 转,表明 Dmrt1 是鱼类雄性性别分化通路必需基 因。金钱鱼 XX 雌鱼缺乏雄性必需的 Dmrt1. 所以 不能诱导培育 XX 伪雄鱼, 这是金钱鱼全雌化苗 种培育的新瓶颈, 亟待突破。本研究中1 龄金钱 鱼雌鱼比雄鱼生长快 27.3%, 这与蔡泽平等<sup>[16]</sup>报 道的人工养殖条件下1龄金钱鱼雌鱼生长速度比 雄鱼快 30%左右的结果基本一致, 细微差异可能 是由于饲养条件不同造成。同一批次的金钱鱼中, 也有部分雄鱼生长较快,表明存在通过选择育种 提升雄鱼生长速率的空间。此外, 雄鱼具有性腺 指数较小的优势,如 XY 雌鱼可育,将来或可开 展金钱鱼全雄苗种培育。培育快速生长全雄苗种 可能是未来金钱鱼育种的方向。

#### 参考文献:

- 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: 124-136. [梅洁, 桂 建芳. 鱼类性别异形和性别决定的遗传基础及其生物技 术操控[J]. 中国科学: 生命科学, 2014, 44(12): 1198-1212.]
- [2] Yoneda M, Kurita Y, Kitagawa D, et al. Age validation and growth variability of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* off the Pacific coast of northern Japan[J]. Fisheries Science, 2007, 73(3): 585-592.
- [3] Chen S L, Li J, Deng S P, et al. Isolation of female-specific AFLP markers and molecular identification of genetic sex in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. Marine Biotechnology, 2007, 9: 273-280.
- [4] Zheng S Q, Wang X S, Zhang S, et al. Screening and characterization of sex-linked DNA markers and marker-assisted selection in the Southern catfish (*Silurus meridionalis*)[J]. Aquaculture, 2020, 517: 734783.
- [5] Han C, Zhu Q Y, Lu H M, et al. Screening and characterization of sex-specific markers developed by a simple NGS method in mandarin fish (*Siniperca chuatsi*)[J]. Aquaculture, 2020, 527: 735495.
- [6] Wang D, Mao H L, Chen H X, et al. Isolation of Y- and

X-linked SCAR markers in yellow catfish and application in the production of all-male populations[J]. Animal Genetics, 2009, 40(6): 978-981.

- [7] Sun Y L, Jiang D N, Zeng S, et al. Screening and characterization of sex-linked DNA markers and marker-assisted selection in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Aquaculture, 2014, 433: 19-27.
- [8] Ou M, Yang C, Luo Q, et al. An NGS-based approach for the identification of sex-specific markers in snakehead (*Channa* argus)[J]. Oncotarget, 2017, 8(58): 98733-98744.
- [9] Wang T, Li Z, Yu Z X, et al. Production of YY males through self-fertilization of an occasional hermaphrodite in Lanzhou catfish (*Silurus lanzhouensis*)[J]. Aquaculture, 2021, 539: 736622.
- [10] Barry T P, Fast A W. Biology of the spotted scat (*Scatopha-gus argus*) in the Philippines[J]. Asian Fisheries Science, 1992, 5: 163-179.
- [11] Yang W, Chen H P, Jiang D N, et al. An overview on biology and artificial propagation and culture in the spotted scat *Scatophagus argus*[J]. Journal of Biology, 2018, 35(5): 104-108. [杨尉, 陈华谱, 江东能, 等. 金钱鱼生物学及繁养殖技术研究进展[J]. 生物学杂志, 2018, 35(5): 104-108.]
- [12] Mu X J, Su M L, Gui L, et al. Comparative renal gene expression in response to abrupt hypoosmotic shock in spotted scat (*Scatophagus argus*)[J]. General and Comparative Endocrinology, 2015, 215: 25-35.
- [13] Zhang B J, Liang R J, Mao D N, et al. Growth characteristic and its salt-water pond rearing of *Scatophagus argus*[J]. Modern Fisheries Information, 1999, 14(10): 8-12, 15. [张邦杰,梁仁杰,毛大宁,等. 金钱鱼的生长特性与咸水池塘 驯养[J]. 现代渔业信息, 1999, 14(10): 8-12, 15.]
- [14] Pei Y, Li D, Zhu C H. Changes of physicochemical factors and community structure of plankton in mode of *Litopenaeus vannamei* mixed with *Scatophagus argus* in intensive pond[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2012, 32(1): 68-74.
  [裴宇,黎东,朱春华. 凡纳滨对虾与金钱鱼混养模式水质 理化因子及浮游生物群落结构的变化[J]. 广东海洋大学 学报, 2012, 32(1): 68-74.]
- [15] Yang W, Wang Y R, Jiang D N, et al. ddRADseq-assisted construction of a high-density SNP genetic map and QTL fine mapping for growth- related traits in the spotted scat (*Scatophagus argus*)[J]. BMC Genomics, 2020, 21: 278.
- [16] Cai Z P, Wang Y, Hu J W, et al. Reproductive biology of Scatophagus argus and artificial induction of spawning[J]. Journal of Tropical Oceanography, 2010, 29(5): 180-185. [蔡 泽平, 王毅, 胡家玮, 等. 金钱鱼繁殖生物学及诱导产卵 试验[J]. 热带海洋学报, 2010, 29(5): 180-185.]
- [17] Cui D, Liu Z W, Liu N X, et al. Histological study on the gonadal development of *Scatophagus argus*[J]. Journal of

Fisheries of China, 2013, 37(5): 696-704. [崔丹, 刘志伟, 刘南希, 等. 金钱鱼性腺发育及其组织结构观察[J]. 水产 学报, 2013, 37(5): 696-704.]

- [18] Zhang M Z, Deng S P, Zhu C H, et al. Effects of temperature on ovarian development in *Scatophagus argus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(3): 599-606. [张敏智, 邓思平,朱春华,等. 温度对金钱鱼卵巢发育的影响[J]. 中国水产科学, 2013, 20(3): 599-606.]
- [19] Li G L, Zhang M Z, Deng S P, et al. Effects of temperature and fish oil supplementation on ovarian development and foxl2 mRNA expression in spotted scat *Scatophagus argus*[J]. Journal of Fish Biology, 2015, 86(1): 248-260.
- [20] Zhang G, Wang W, Su M L, et al. Effects of recombinant gonadotropin hormones on the gonadal maturation in the spotted scat, *Scatophagus argus*[J]. Aquaculture, 2018, 483: 263-272.
- [21] Zhang K W, Chen H P, Jiang D N, et al. Insulin- like growth factors 1 and 2 in spotted scat (*Scatophagus argus*): Molecular cloning and differential expression during embryonic development[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2018, 38(2): 7-14. [张克伟,陈华谱,江东能,等. 金钱鱼 IGF-1和 IGF-2 的克隆及其在胚胎发育过程的表达[J]. 广东海洋大学学报, 2018, 38(2): 7-14.]
- [22] Mandal B, Kailasam M, Bera A, et al. Gonadal recrudescence and annual reproductive hormone pattern of captive female spotted scats (*Scatophagus argus*)[J]. Animal Reproduction Science, 2020, 213: 106273.
- [23] Mandal B, Kailasam M, Bera A, et al. Standardization of oocyte size during artificial fertilization and optimization of stocking density during indoor larval and outdoor nursery rearing of captive spotted scat (*Scatophagus argus*) for a viable juvenile production system[J]. Aquaculture, 2021, 534: 736262.
- [24] Mustapha U F, Jiang D N, Liang Z H, et al. Male-specific Dmrt1 is a candidate sex determination gene in spotted scat (Scatophagus argus)[J]. Aquaculture, 2018, 495: 351-358.
- [25] Huang Y Q, Jiang D N, Li M, et al. Genome survey of male and female spotted scat (*Scatophagus argus*)[J]. Animals, 2019, 9(12): 1117.
- [26] Huang Y Q, Mustapha U F, Huang Y, et al. A chromosome—level genome assembly of the spotted scat (*Scato-phagus argus*)[J]. Genome Biology and Evolution, 2021, 13(6): evab092.
- [27] Jiang D N, Mustapha U F, Shi H J, et al. Expression and transcriptional regulation of gsdf in spotted scat (*Scatophagus argus*)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2019, 233: 35-45.
- [28] Nagahama Y, Chakraborty T, Paul-Prasanth B, et al. Sex determination, gonadal sex differentiation, and plasticity in vertebrate species[J]. Physiological Reviews, 2021, 101(3): 1237-1308.
- [29] Wu R F, Xu X M, Zhou Q. Evolution of sex determination

mechanisms and sex chromosomes[J]. Scientia Sinica (Vitae), 2019, 49(4): 403-420. [吴芮封, 徐小曼, 周琦. 性别决定机 制和性染色体的演化[J]. 中国科学: 生命科学, 2019, 49(4): 403-420.]

- [30] Palaiokostas C, Bekaert M, Khan M G Q, et al. Mapping and validation of the major sex-determining region in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) using RAD sequencing[J]. PLoS ONE, 2013, 8(7): e68389.
- [31] Liu H Y, Pang M X, Yu X M, et al. Sex-specific markers developed by next-generation sequencing confirmed an XX/XY sex determination system in bighead carp (*Hypoph-thalmichthys nobilis*) and silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*)[J]. DNA Research, 2018, 25(3): 257-264.
- [32] Wang L, Xie N, Shen Y B, et al. Constructing high-density genetic maps and developing sexing markers in northern snakehead (*Channa argus*)[J]. Marine Biotechnology, 2019, 21(3): 348-358.
- [33] Lin A Q, Xiao S J, Xu S B, et al. Identification of a male-specific DNA marker in the large yellow croaker (*Lari-michthys crocea*)[J]. Aquaculture, 2017, 480: 116-122.
- [34] Wu X, Zhao L, Fan Z, et al. Screening and characterization of sex-linked DNA markers and marker- assisted selection in blue tilapia (*Oreochromis aureus*)[J]. Aquaculture, 2021, 530: 735934.
- [35] Long J, Zheng S Q, Wang X S, et al. Role of TGF-β signaling pathway in sex determination and differentiation in fish[J]. Journal of Fisheries of China, 2020, 44(1): 166-177. [龙娟, 郑树清, 王晓双, 等. TGF-β 信号通路在鱼类性别 决定与分化中的作用[J]. 水产学报, 2020, 44(1): 166-177.]
- [36] Matsuda M, Sakaizumi M. Evolution of the sex- determining gene in the teleostean genus *Oryzias*[J]. General and Comparative Endocrinology, 2016, 239: 80-88.
- [37] Koyama T, Nakamoto M, Morishima K, et al. A SNP in a steroidogenic enzyme is associated with phenotypic sex in *Seriola* fishes[J]. Current Biology, 2019, 29(11): 1901-1909.
- [38] Guo L, Yang J W, Liu B S, et al. Colinearity based sexspecific marker development in the golden pompano (*Trachinotus ovatus*)[J]. Aquaculture, 2021, 544: 737044.
- [39] Sun S, Li W B, Xiao S J, et al. Genetic sex identification and the potential sex determination system in the yellow drum (*Ni-bea albiflora*)[J]. Aquaculture, 2018, 492: 253-258.
- [40] He F X, Jiang D N, Huang Y Q, et al. Comparative transcriptome analysis of male and female gonads reveals sex-biased genes in spotted scat (*Scatophagus argus*)[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2019, 45: 1963-1980.
- [41] Mustapha U F, Huang Y, Huang Y Q, et al. Gonadal development and molecular analysis revealed the critical window for sex differentiation, and E2 reversibility of XY-male spotted scat, *Scatophagus argus*[J]. Aquaculture, 2021, 544: 737147.
- [42] Masuyama H, Yamada M, Kamei Y, et al. Dmrt1 mutation causes a male-to-female sex reversal after the sex determina-

tion by *Dmy* in the medaka[J]. Chromosome Research, 2012, 20(1): 163-176.

[43] Wu K, Song W Y, Zhang Z W, et al. Disruption of *dmrt1* rescues the all-male phenotype of *cyp19a1a* mutant in zebrafish–a novel insight into the roles of aromatase/estrogens in gonadal differentiation and early folliculogenesis[J]. Development, 2020, 147(4): dev182758.

[44] Dai S F, Qi S S, Wei X Y, et al. Germline sexual fate is determined by the antagonistic action of *dmrt1* and *foxl3/foxl2* in tilapia[J]. Development, 2021, 148(8): dev199380.

# A rapid method for genetic sex identification in the spotted scat (*Scatophagus argus*)

# HUANG Yang, HUANG Yuanqing, DENG Qiumin, MUSTAPHA Umar Farouk, PENG Youxing, LI Guangli, JIANG Dongneng

Fisheries College of Guangdong Ocean University, Guangdong Province Famous Fish Reproduction Regulation and Breeding Engineering Technology Research Center of Engineering Technology Research Center, Zhanjiang 524088, China

Abstract: The spotted scat (Scatophagus argus) is a valuable fish species in the southeast coastal areas of China. The female of this species grows at a comparatively more rapid pace than its male counterparts; as such, mono-female fingerlings may be used to improve production. In a previous study, the spotted scat was shown to possess an XX-XY sex-determination system. The truncate Dmrt1b and normal Dmrt1 are located on the X and Y chromosome, respectively; the male-specific Dmrt1 is the candidate sex determination gene. However, the lack of a rapid and accurate sex-specific marker has hampered the establishment of sex control during the breeding process, and investigations of sex determination and differentiation mechanisms in spotted scat. This study designed three pairs of sex-specific primers on Dmrt1/Dmrt1b according to published male and female genomic data on spotted scat using next-generation sequencing technology. The sex-specificity of these primers was validated using the polymerase chain reaction (PCR)-amplification in three male and female fish. All three markers were able to amplify the Y chromosome-specific band or the X and Y chromosome-specific bands. One pair of these primers, the Dmrt1-Marker-4-F/R, are a pair of co-dominant sex-specific primers located on the 3' untranslated region of Dmrt1. A single 593 bp-X chromosome-specific fragment was amplified in female fish using the *Dmrt1*-Marker-4-F/R primers, while the 593 bp-X and 693 bp-Y were specific fragments amplified in male fish. The Dmrt1-Marker-4-F/R were subsequently tested in three different geographic populations of spotted scat (213 tails in total) from the South China Sea; the results of the genetic sex were consistent with their phenotypic sex. This sex-specific maker confirmed that the spotted scat possesses an XX-XY sex-determination system. It also implied that developing sex-specific markers in the sex determination gene or candidate sex determination gene region is very effective. In addition, this pair of primers was able to amplify shorter length deoxyribonucleic acid (DNA) fragments extracted by a rapid DNA extraction kit. This study establishes a time-effective and straightforward method for rapid genetic sex identification in spotted scat, accelerating the development of sex control breeding in spotted scat. However, the XX fish lack Dmrt1, critical for testicular development and male reproduction; this means it is impossible to reverse the sex of the XX female to a functional neo-male and as such, a genetically all-female fingerling is currently unavailable. As the phenotypic XX-female is irreversible, it becomes a new bottleneck for the sex control breeding of spotted scat. The growth comparison experiment demonstrated that some XY male fish were observed to be growing at a more rapid rate than some of the XX females; the XY spotted scat is sexually reversible. This means that selective breeding and sex control technologies may be combined to produce fast-growing all-male spotted scat in future.

Key words: *Scatophagus argus*; genotypic sex; molecular marker; next-generation sequencing Corresponding author: JIANG Dongneng. E-mail: dnjiang@gdou.edu.cn