

一个奥利亚罗非鱼雌性特异性 SCAR 标记的建立

杨 玲 孟庆磊* 李 娴 付佩胜 安 丽 董学飒 张龙岗 刘羽清

(山东省淡水水产研究所 山东省淡水水产遗传育种重点实验室, 济南 250117)

摘 要 以奥利亚罗非鱼 *Oreochromis aureus* 为实验材料, 通过对 800 多条随机引物的筛选, 获得了 1 个奥利亚罗非鱼雌性特异性的、长度为 1 488 bp 的 RAPD 标记片段 RAPD₇₁₆₉₉₋₁₄₈₈, 经琼脂糖凝胶电泳后回收、克隆、测序, 并根据测序结果设计 PCR 特异引物, 再经 PCR 条件优化, 成功地将该 RAPD 标记片段转化为实验结果稳定、操作简便的 SCAR 标记, 即 SCAR_{OaF1488}。采用双重 PCR 技术, 以 mtDNA 16S rRNA 基因片段为 PCR 扩增阳性对照, 对该标记的有效性在两个群体共 200 个个体(雌、雄各 100 个)中进行验证。结果显示, 标记检测结果与表型性别的符合度为 100%。SCAR_{OaF1488} 标记的获得为奥利亚罗非鱼遗传性别鉴定及标记辅助选择提供了有效工具, 为深入研究鱼类性别相关基因及性别决定机制提供了重要线索和新的思路。

关键词 奥利亚罗非鱼 性别 分子标记 RAPD SCAR

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2011)04-0034-07

Establishment of a female specific SCAR marker in blue tilapia *Oreochromis aureus*

YANG Ling MENG Qing-lei* LI Xian FU Pei-sheng AN Li
DONG Xue-sa ZHANG Long-gang LIU Yu-qing

(Shandong Provincial Key Laboratory of Freshwater Genetics and Breeding, Freshwater Fisheries
Research Institute of Shandong Province, Jinan 250117)

ABSTRACT A female specific random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker was obtained in blue tilapia *Oreochromis aureus* through screening 800 random primers. The female specific DNA fragment with a length of 1 488 bp was cloned, sequenced, and converted into a SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) marker, SCAR_{OaF1488}. A duplex PCR method was developed to amplify SCAR_{OaF1488} together with a 509-bp-long mtDNA 16S rRNA gene fragment which served as a positive control. Two hundred individuals originated from 2 populations, including 100 males and 100 females, were used to verify the reliability of the SCAR marker by using the duplex PCR method. The sex identification test results of 200 fish showed 100% accordance with their phenotypic sex. SCAR_{OaF1488} was successfully amplified in all female

山东省农业良种工程重大课题资助

* 通讯作者。E-mail: qingleimeng@126.com

收稿日期: 2010-12-21; 接受日期: 2011-04-03

作者简介: 杨 玲(1967-), 女, 研究员, 主要从事鱼类遗传育种研究。E-mail: jnsyang@163.com

but not in male individuals. By contrast, the control fragment was amplified in all the males and females. The female-specific marker SCAR_{OaF1488} developed in the present study can be used for molecular identification of genetic sex in blue tilapia. In addition, this work will provide an important tool for screening and isolation of the sex-determining locus and sex manipulation in this tilapia.

KEY WORDS Blue tilapia *Oreochromis aureus* Sex Molecular marker
RAPD SCAR

鱼类的遗传学研究及育种实践中常常要求鉴别其性染色体组成,但是大多数鱼类性染色体分化程度较低,没有性染色体,少数鱼类经遗传学实验证明存在性染色体,但从细胞遗传学上却鉴别不出。加之鱼类性别分化在胚胎发育过程中可受环境因素影响(如温度、光照和食物等),导致其性别表型与遗传型不一致(Devlin *et al.* 2002)。传统遗传性别鉴定是将每个待测个体测交,根据其子代性别比例来确定,费时费力。因此,有必要探寻一种可以识别其遗传组成的简便方法,而性别特异性的分子标记无疑是一种简捷有效的鉴别方法。目前,在大鳞大麻哈鱼 *Oncorhynchus tshawytscha* (Devlin *et al.* 1994)、青鳉 *Oryzias latipes* (Matsuda *et al.* 1997)、三刺鱼 *Gasterosteus aculeatus* (Griffiths *et al.* 2000)、非洲鲇 *Clarias gariepinus* (Kovacs *et al.* 2001)、半滑舌鳎 *Cynoglossus semilaevis* (Chen *et al.* 2007) 等几种鱼类已筛选出性别特异性标记并用于遗传性别鉴定。

奥利亚罗非鱼 *Oreochromis aureus* 是我国引进的几种罗非鱼中经济价值较高的种类之一,目前被广泛应用于全雄杂交罗非鱼育种。研究表明,奥利亚罗非鱼性别决定主要为遗传决定,为 ZW 性别决定型,但和大多数鱼类一样没有形态上可区分的有丝分裂性染色体,因此无法利用传统的核型分析来鉴别其遗传性别(Campos-Ramos *et al.* 2001)。本研究拟利用 RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)分子标记技术,检测雌、雄奥利亚罗非鱼基因组 DNA 间的差异,寻找性别特异的标记片段,并将其转化成结果稳定、便于检测的 SCAR(Sequence Characterized Amplified Region)标记,以期与奥利亚罗非鱼遗传性别鉴定及标记辅助选择提供有效工具,为深入了解罗非鱼性别决定机制,更好地开展罗非鱼育种实践有所裨益。

1 材料和方法

1.1 实验材料

实验用奥利亚罗非鱼取自山东省淡水水产研究所国家级罗非鱼良种场,为 2000 年自埃及引进原种及 2007 年自无锡淡水渔业中心引进品系的保种群体。随机抽取埃及保种群体 30 尾(雌、雄各 15 尾)用于 RAPD 标记筛选,埃及和无锡保种群体各 100 尾(雌、雄各 50 尾)用于 SCAR 标记验证。实验鱼体长 14.1~38.3cm,体重 46.5~1 235.3g,于繁殖季节,采用形态判断与挤压排卵排精双重确认的方法确定其表型性别,活体剪取少量尾鳍鳍尖用于 DNA 提取。

1.2 基因组 DNA 的提取

采用上海生工生物工程技术有限公司生产的柱式动物基因组 DNA 抽提试剂盒提取基因组 DNA。紫外分光光度计测定 DNA 的浓度和纯度,1.0%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量,最后统一调整其浓度至 100 ng/ μ l。

1.3 性别特异 RAPD 标记的筛选

随机引物由上海生工生物工程技术有限公司合成,PCR 仪为德国 PEQSTAR 梯度 PCR 仪。分别以雌、雄奥利亚罗非鱼 DNA 为模板进行 RAPD 引物筛选,对其中产生性别特异条带的引物,增加样本数量进行重复验证。PCR 反应体系为 25 μ l,含 10 \times Buffer (TaKaRa) 2.5 μ l;MgCl₂ (25 mmol/L) 3 μ l;dNTPs (TaKaRa,各 2.5 mmol/L) 2 μ l;随机引物(2 μ mol/L) 2.5 μ l;Taq DNA 聚合酶(TaKaRa, 5 U/ μ l) 0.2 μ l;模板 DNA 1.5 μ l;补足灭菌去离子水至 25 μ l。扩增程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,36 $^{\circ}$ C 退火 50 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 2

min, 45 个循环; 72 °C 延伸 10 min。参考各引物的 T_m 值, 调整 PCR 反应的退火温度。

1.4 RAPD 标记片段的克隆与测序

RAPD 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 对目标片段进行切胶回收。目的片段经上海生工生物工程技术服务有限公司的胶回收试剂盒纯化, 再与 PGEM-T EASY 载体 4 °C 连接过夜。取 5 μ l 连接产物转化大肠杆菌 TOP 10 感受态细胞, 通过蓝白斑筛选和 PCR 确认相结合的方法筛选阳性克隆, 送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

1.5 引物设计与 SCAR 分析

1.5.1 引物设计

采用 Primer premier 5.0 软件, 根据目标片段 DNA 测序结果, 结合引物设计的一般原则, 在原有 RAPD 引物的基础上, 向 3' 端延伸 13~19 个 nt, 设计用于 SCAR 分析的引物 1 对。根据 mtDNA 16S rRNA 基因序列 (GenBank 登录号: GU370125) 设计 1 对引物 (上游引物序列: 5'-acggccgcggtattttgac-3', 下游引物序列: 5'-gttgaacaaacgaaccctt-3'), 特异性扩增长度为 509 bp 的基因片段作为 PCR 扩增阳性对照。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

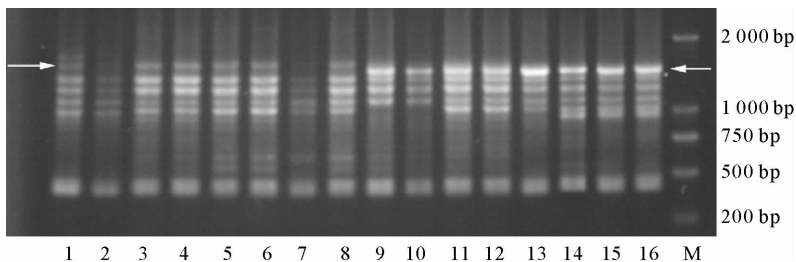
1.5.2 SCAR 分析

将合成的 SCAR 引物及 mtDNA 16S rRNA 引物以不同性别的奥利亚罗非鱼 (雌、雄各 100 条) 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 以分析其有效性。反应体系为 25 μ l, 含 10 \times Buffer (TaKaRa) 2.5 μ l; MgCl₂ (25 mmol/L) 2 μ l; dNTPs (TaKaRa, 各 2.5 mmol/L) 2 μ l; SCAR 上、下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.5 μ l; 16S rRNA 上、下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.25 μ l; Taq DNA 聚合酶 (TaKaRa, 5 U/ μ l) 0.25 μ l; DNA 模板 1.5 μ l; 补足灭菌去离子水至 25 μ l。反应程序为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 40 s, 62.3 °C 退火 50 s, 72 °C 延伸 50 s, 共 35 个循环; 72 °C 延伸 7 min。

2 结果

2.1 性别特异性 RAPD 标记的筛选

通过对 800 多条随机引物在不同性别奥利亚罗非鱼个体的基因组 DNA 扩增, 结果发现引物 RAPD₇₁₆₉₉ (引物序列: 5'-gtgacgtagg-3') 能够扩增出雌、雄性别特异条带 (图 1)。其中, 雌性特异条带十分明亮, 且在不同个体中均有较强的扩增, 片段大小约 1 500 bp; 雄性特异条带较雌性条带亮度差, 且在不同个体中扩增强度差别较大, 片段大小比雌性条带稍大。该引物在 30 个个体中验证, 均可扩增出具有明显差异的雌、雄特异条带, 因此可认为是奥利亚罗非鱼性别特异性的 RAPD 标记。我们成功地将雌性特异片段进行了克隆、测序和 SCAR 标记转化。



泳道 1~8 为雄性, 9~16 为雌性, 箭头示性别特异性片段, M 为 DL2000 Marker。引物序列: 5'-gtgacgtagg-3'
Lanes 1~8: Male individuals; Lanes 9~16: Female individuals; The arrows show sex-specific DNA fragments;
M is DL2000 Marker. Sequence of the RAPD primer: 5'-gtgacgtagg-3'

图 1 奥利亚罗非鱼性别特异性 RAPD 标记

Fig. 1 Sex-specific RAPD marker in *O. aureus*

2.2 雌性特异性 RAPD 片段的序列分析

经测序获得的奥利亚罗非鱼雌性特异性 RAPD 片段长为 1 488 bp (GenBank 登录号: JF284171), 序列组成为 T (32.59%) > A (28.23%) > C (19.69%) > G (19.49%), AT (60.82%) > GC (39.18%), 片段两端含 RAPD 引物结合区。与 NCBI 数据库比对发现该序列从 40 bp 至 332 bp 处长 293 bp 的片段与另一种丽鱼科 Cichlidae 鱼类 *Astatotilapia burtoni* 的 Hoxba 基因家族 (GenBank 登录号: EF594310) 序列同源性较高 (图 2), 序列一致性高达 93%, 其余部分没有发现较高同源性序列。该高同源性区域是位于 *A. burtoni* Hoxb7a 基因和 Hoxb6a 基因之间的保守非编码区 (CNS, Conserved Non-coding Sequence), 其功能尚不可知 (Hoegg *et al.* 2007)。

OaF1488	<u>GTGACGTAGG</u>	<u>TAGAATCATG</u>	GCGGCAGTCA	ACGACGGTCC	AGGCGTGGGA	TTTCTCTCGT	60
AbHoxba	-----	-----	-----	-----	...T.....C.....	131348
OaF1488	GGAAATATGC	ACATTATCTT	TTCTTTCTTA	TTGGTAGGTG	GCACAGTGA	CTTGTGGCAA	120
AbHoxbaG..T..	..T...A..A..A....	131408
OaF1488	GTAAGCAAGC	TAGAAGACTG	ACAATCTTGC	TGGGTATCTA	GTTACGGAAG	CAACACATTA	180
AbHoxbaT..	G.....C..A..	131468
OaF1488	ACAAGAGAAG	TCTGAGTAAA	ACCAAAGTTA	CTTTCCCTAG	TAAGTAGTAA	CTTTGAAAGT	240
AbHoxbaTT.....	..C.....	131528
OaF1488	AACGAGTAAC	TTGAAGTAAC	TGAGTTACTT	TTGATGGAAG	TAAGTAGTAA	TGTAAGTAAG	300
AbHoxba	C.....A...A.....	131588
OaF1488	TTACTAATTT	AAAGTAACCT	ACCCAACACT	GGATATGATA	TATAGGCACC	CCTCTCTTTC	360
AbHoxba-----	-----	-----	131620
OaF1488	CATCTCTACT	AACCAAGATA	GATCAACGCC	TTTTTTTTTT	ACACCGCGGG	ACACGACAAG	420
	GCTGTCCCTT	GAGCCTTTTG	CTCTTCACAA	TTTCTATFGA	ACCTCTTGCA	GTAGCCATTA	480
	GGAAATGAGC	CTCTATTGAC	CCTGTCCAAT	TGGGGAATAT	CAAGCACTAC	ATTTCTTTAT	540
	ATGCGGATGA	TGTTGTTTTG	TTCTTTGTCAA	ATCCTGAGCG	ATCTGTTCTC	GTACTTTTAG	600
	ATGTGGTGAG	GTCATTTGGG	GAAATCTCAG	GTTACACAAT	TAATTTGGCAG	AAGAGTGAGT	660
	TTGTGGCTTT	AACTGCAAAC	TTGGATGTTG	ATTTTTTGAA	AAATTTGCGT	TTTAAGATTA	720
	CAGACAGATT	GAAATACTTT	GGTGTATTTT	TGCCTAAGGA	TCCTAAAAGT	ATCTTTAAGT	780
	TGAATTATCT	TGAACAAGTT	GAAAAATGTA	AAAAGGACAT	TGAGAAAATGG	AGGGCTCTCC	840
	CTATCTCCAT	GGTAGGTCGC	ATTAATGTAA	TCAAAATGGT	TTCCCTTCTC	AAATTTCTAT	900
	ATTTGCTTTT	AAACTTACCT	ATTTTTTTGA	ATAAGCAATT	TTTTAAAAGT	ATCGACTCAG	960
	TAGTATTACC	ATTTGTTTGG	GGCTTTAAAA	CTCACAGGAT	ATCAAAAAGT	CATCTATGTT	1020
	AGTCTAAACT	TAAGGGTGGG	TTTGCCTCTC	CACTGTTTCA	GTTTTATTAT	TGGGCTGCAA	1080
	ATTTCTAGAAC	TCTTGCTTAC	TGGCAGGAAG	GGTACAAAAA	CGACATGTCT	GCCGATACCC	1140
	CCCCCCCCCA	CACACACACA	CACACAGGTG	GTCATAGAGA	GTGGTGGGGT	TGAGAATAGT	1200
	TCCCTCCCTG	CTCTCTTTT	TTCTGCTCTC	AATCTGCGAA	CCAAGGTCAA	TAATTTTATA	1260
	GTTTTCGAAC	CGCTTAAAAA	CTTTAGTCAG	ATCAAAAAAG	GTTGTGGTCT	ACCGACACT	1320
	TCGATCCACA	CTCCAATATA	CGTAATCATG	CATTTTCGACC	CTCATGTTTA	GACGCCTCGT	1380
	TTGAGGTCTG	GACACAGAAG	GGTATTATTA	CTCTCAAAGA	TTTATATATT	GACAGGCAGT	1440
	TTGCATCATT	TACTCAGTTG	CAGAACAAGT	TCTCTCTCCC	TACGTCAC		1488

双下划线标注的为 RAPD 引物结合区, 单下划线标注的为 SCAR 引物结合区。点(.)表示相同核苷酸组成, 杠(-)表示非同源序列
The dots (.) indicate the homologous sequence, and the bars (-) indicate the non-homologous sequence. RAPD primer binding regions in

O. aureus were marked by double underline, and SCAR primer binding regions were marked by underline

图 2 奥利亚罗非鱼雌性特异性 RAPD 片段序列 (OaF1488, GenBank 登录号: JF284171) 及其与 *Astatotilapia burtoni* Hoxba 基因家族 (AbHoxba, GenBank 登录号: EF594310) 同源比对结果

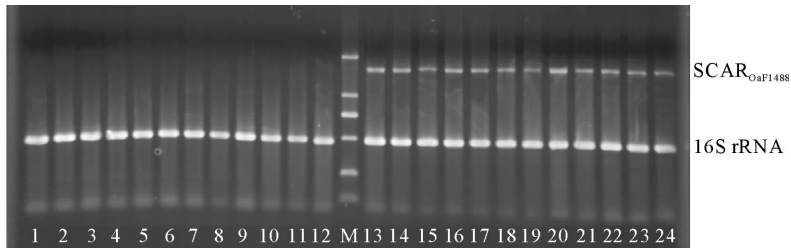
Fig. 2 Sequence alignment of *O. aureus* female-specific RAPD fragment (OaF1488, GenBank accession No. JF284171)

with the homologous DNA fragment of *Astatotilapia burtoni* Hoxba gene cluster (AbHoxba, GenBank accession No. EF594310)

2.3 雌性特异性 SCAR 标记的获得与验证

根据目标片段测序结果, 合成了 1 对 PCR 引物 (预期扩增片段大小 1 488 bp), 即 SCAR_{OaF1488} (上游引物序列: 5'-gtgacgtaggtagaatcatggcggc-3'; 下游引物序列: 5'-gtgacgtaggagagagaactgtt-3')。用这对引物及 16S rRNA 引物对奥利亚罗非鱼雌雄各 100 个, 共 200 个样本的基因组 DNA 进行 PCR 扩增验证, 扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝

胶电泳检测(图 3)。结果表明,所有雄性个体扩增产物都只有 1 条大小约 500 bp 的条带(阳性对照,16S rRNA 基因片段),而所有雌性个体扩增产物都有两条扩增条带,其中 1 条与雄性扩增条带大小相同,另一条为雌性个体特有,大小约 1 500 bp。标记检测结果与表型性别的符合度为 100%,表明该 SCAR 标记具有适用性,可以用于奥利亚罗非鱼遗传性别的鉴定。



泳道 1~12 为雄性,13~24 为雌性。M 为 DL2 000 Marker,大小依次为 2 000、1 000、750、500、200、100 bp

Lanes 1~12: Male individuals; Lanes 13~24: Female individuals; M: DL2000 marker with

2 000, 1 000, 750, 500, 200 and 100 bp DNA ladders

图 3 奥利亚罗非鱼雌性特异性 SCAR 标记

Fig. 3 Female-specific SCAR marker of *O. aureus*

3 讨论

鱼类性别决定机制的深入研究,对于鱼类性控育种以及研究脊椎动物的系统进化具有重要意义。鱼类作为较为低等的脊椎动物,其性别决定机制和性腺分化极其复杂,遗传因素是性别发育的基础,而性别分化还受外部环境因子的影响,温度、光照、水质、个体密度、社会因素等都可能在不同程度上影响鱼类的性别(Devlin *et al.* 2002)。已有研究表明,特定敏感时期对罗非鱼幼鱼进行一定强度的高温或低温处理都可能导致群体中雄性比例的明显增高,即雌性遗传性别向雄性表型的转变(Desprez *et al.* 1998; Abucay *et al.* 1999; Devlin *et al.* 2002; Baroiller *et al.* 2009)。另外,鱼类的常染色体也有可能参与性别决定,表现为性别决定的多因子剂量效应。这可能是为什么尼罗罗非鱼 YY 超雄性与正常 XX 雌性的后代甚至只有 69% 为雄性(Mair *et al.* 1997。),XX 伪雄鱼与正常 XX 雌鱼的后代甚至仅有 65% 为雌性的原因(Baroiller 1996)。

目前人们对于在鱼类性别决定与分化过程中起关键作用的基因或染色体区域还知之甚少,研究过程经历了从在鱼类基因组中寻找哺乳动物性别基因的同源基因,到逐渐转向寻找鱼类自身性别决定基因的过程。在罗非鱼的性别研究方面,董江水等(2003)根据人类 Y 染色体上的性别决定基因 SRY 基因(Sex-determining region Y),设计特异性引物扩增 3 种罗非鱼的 SRY 同源基因。结果表明,在奥利亚、尼罗 *O. niloticus* 以及尼罗杂交鱼(*O. niloticus* ♀ × *O. aureus* ♂)的雌、雄个体中都出现大小一致的 1 条带,无性别差异。杨弘等(2005)对尼罗和奥利亚两种罗非鱼雌、雄个体 SRY 基因同源序列进行序列分析,发现两种鱼其雌、雄间序列相似性都为 99.5%,扩增片段长度上无差异。张定东(2001)以 SRY 同源序列(SRY-box, SOX)设计引物,在雌、雄罗非鱼中进行 PCR 扩增,结果发现二者都有扩增带,认为其在进化中比较保守,在罗非鱼中无性别特异性。杨东等(2008)在雌、雄尼罗罗非鱼基因组中,分别筛选鉴定出 *Sox1a*、*Sox1b*、*Sox3*、*Sox4* 和 *Sox12* 基因 HMG-box,然而这 5 个 *Sox* 基因在尼罗罗非鱼中无性别类型差异。Matsuda 等(2002)发现了青鲮性别决定基因 DMY(Doublesex/mab-3 domain of Y chromosome),该基因是 1 个雄性特异性基因,在雌性染色体上没有其同源序列,也是迄今鱼类在 Y 染色体上找到的、与精巢发生与分化直接相关证据最充分的 1 个性别决定功能基因。然而,Kondo 等(2003)以青鲮 DMY 和 DMRT1 基因为探针,在罗非鱼等 5 种鱼类中未能检测出雄性特异条带,证明 DMY 基因为青鲮所独有,在其他鱼类中不存在。

鱼类的遗传学研究及育种实践中常常要求鉴别其性染色体组成,由于大多数鱼类性染色体分化程度较低,没有明显形态上可区分的性染色体,故无法用核型分析来鉴别。传统的测交分析虽然可以鉴别遗传性别,但需

要等到子代性成熟,且需要建立和维持家系,费时费力。探索性别相关的分子标记无疑是识别其遗传性别的简便方法,且分子检测技术痕量、灵敏的特点为活体快速鉴定提供了可能。目前,在大鳞大麻哈鱼(Devlin *et al.*, 1994)、青鳉(Matsuda *et al.*, 1997)、三刺鱼(Griffiths *et al.*, 2000)、非洲鲷(Kovacs *et al.*, 2001)、半滑舌鲷(Chen *et al.*, 2007)等鱼类已筛选出性别特异性标记并用于遗传性别鉴定。奥利亚罗非鱼虽然被证实主要为 ZW 性别决定型,但和大多数鱼类一样没有形态上可区分的有丝分裂性染色体。虽然减数分裂联会复合体分析揭示了雌、雄性别间染色体行为的差异(Campos-Ramos *et al.*, 2001),但该方法由于需要牺牲实验鱼所以并不适合育种应用。近年来, Lee 等(2004)用分离群体分组分析法(BSA, Bulk Segregant Analysis)获得了 11 个位于表型性别相关连锁群 LG3 上的微卫星标记,并且利用该假定 W 染色体单倍型成功预测了 97% 的雄性个体和 85% 的雌性个体的性别。然而,这些标记的获得和验证仅使用了 1 个家系,该方法是否可以用于不同来源的家系和品系的性别鉴定还需要进一步验证。因为该课题组在尼罗罗非鱼中发现使用同样方法获得的假定 Y 染色体单倍型在两个家系中正确地预测了 95% 的个体的性别,但在同一群体的另一个家系中却不适用(Lee *et al.*, 2003)。本研究通过 800 多条随机引物的筛选,获得了 1 个奥利亚罗非鱼雌性特异性 RAPD 标记,并将之转化成使用方便、结果稳定的 SCAR 标记。对标记的适用性在两个不同来源的群体的 200 个个体中进行验证,检测结果与表型性别的符合度为 100%。同时,本研究建立的双重 PCR 检测技术使其遗传性别鉴定可以通过出现 1 条(雄)或者两条(雌)电泳条带的简易模式来确定。而且,本研究结果也表明该鉴别方法可以通过剪取鳍尖少量组织来进行,适合育种实践中活体遗传性别鉴定的要求。

比对分析表明,标记扩增区域的序列有 293bp 的片段与和罗非鱼同科的 *A. burtoni* 的 *Hoxba* 基因家族特定区域(Hoegg *et al.*, 2007)有 93% 的同源性。同源框基因(Homeobox genes, *HOX*)家族和 *SOX* 基因家族是控制生物体发育的两大主要基因家族。*HOX* 基因家族在胚胎发生过程中躯体设计的区域化方面的作用被广泛认知,而 *SOX* 基因与 *DMRT* 等基因家族则在性别决定机制方面受到普遍关注。在斑马鱼等少数模式鱼类 *HOX* 基因虽然研究颇多,但基本都集中在发育和进化方面的探讨,未见性别决定相关的报道(周荣家 2001)。然而,近年来有研究表明,哺乳动物 *HOX* 基因不但影响胚胎发育,而且与成体生殖系统分化有关(白玉妍等 2001)。因此,尽管标记 SCAR_{OaF1488} 产生的原因,结构特征及其在奥利亚罗非鱼性别决定上的功能和机制尚不清楚,然而,该标记的获得不仅为奥利亚罗非鱼的遗传性别鉴定和标记辅助育种提供了有效工具,而且可能为利用荧光原位杂交技术区分其 Z、W 性染色体,乃至为深入研究鱼类性别相关基因及性别决定机制提供了重要线索和新的思路。

参 考 文 献

- 白玉妍,范衡宇,杨增明. 2001. 同源盒基因(*Hox*)与哺乳动物生殖. 生物化学与生物物理进展, 28(3): 329~332
- 杨 东,刘红艳,张繁荣,余来宁. 2008. 尼罗罗非鱼 *SOX* 基因 PCR-SSCP 分析. 江西农业学报, 20 (9): 99~101,104
- 杨 弘,夏德全,许广平,何 杰,曹丽萍,吴婷婷. 2005. 奥利亚罗非鱼和尼罗罗非鱼 *SRY* 基因同源克隆和序列分析. 农业生物技术学报, 13 (4): 524~527
- 张定东. 2001. 罗非鱼 *SOX* 基因 PCR 扩增分析及其性别决定机制初探. 见:南京农业大学硕士学位论文
- 周荣家. 2001. 参与发育的基因家族. 遗传, 23(1): 86~88
- 董江水,张定东. 2003. 罗非鱼的 *SRY* 基因 PCR 扩增分析. 水产养殖, 24 (6): 25~29
- Abucay, J. S., Mair, G. C., Skibinski, D. O. F., and Beardmore, J. A. 1999. Environmental sex determination: the effect of temperature and salinity on sex ratio in *Oreochromis niloticus* L. Aquaculture, 173: 219~234
- Baroiller, J. F. 1996. Significant proportions of unexpected males in progenies from single pair matings with sibling sex-reversed males of *Oreochromis niloticus*. In: Pullin, R. S. V., Lazard, J., Legendre, M., Amon Kothias, J. B., Pauly, D. Eds., The Third Symposium on Tilapia in Aquaculture. ICLARM Conf. Proc. 41: 229~237
- Baroiller, J. F., DCotta, H., Bezault, E., Wessels, S., and Hoerstgen-Schwarz, G. 2009. Tilapia sex determination: Where temperature and genetics meet. Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol. 153(1): 30~38
- Campos-Ramos, R., Harvey, S. C., Masabanda, J. S., Carrasco, L. A., Griffin, D. K., McAndrew, B. J., Bromage, N. R., and Penman, D. J. 2001. Identification of putative sex chromosomes in the blue tilapia, *Oreochromis aureus*, through synaptonemal complex and FISH analysis.

- Genetica, 111: 143~153
- Chen, S., Li, J., Deng, S., Tian, Y., Wang, Q., Zhuang, Z., Sha, Z., and Xu, J. 2007. Isolation of female-specific AFLP markers and molecular identification of genetic sex in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). Mar. Biotechnol. 9: 273~280
- Desprez, D., and Mélard, C. 1998. Effect of ambient water temperature on sex determinism in the blue tilapia *Oreochromis aureus*. Aquaculture, 162: 79~84
- Devlin, R. H., McNeil, B. K., Solar, I. I., and Donaldson, E. M. 1994. A rapid PCR-based test for Y-chromosomal DNA allows simple production of all-female strains of Chinook salmon. Aquaculture, 128: 211~220
- Devlin, R. H., and Nagahamab, Y. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. Aquaculture, 208: 191~364
- Griffiths, R., Orr, K. J., Adam, A., and Barber, I. 2000. DNA sex identification in the three-spined stickleback. J. Fish Biol. 57: 1 331~1 334
- Hoegg, S., Boore, J. L., Kuehl, J. V., and Meyer, A. 2007. Comparative phylogenomic analyses of teleost fish HOX gene clusters; lessons from the cichlid fish *Astatotilapia burtoni*. BMC Genomics, 8: 317
- Kondo, M., Nanda, I., Hornung, U., Asakawa, S., Shimizu, N., Mitani, H., Schmid, M., Shima, A., and Schartl, M. 2003. Absence of the candidate male sex-determining gene *dmrt1b(Y)* of medaka from other fish species. Curr. Biol. 13(5): 416~420
- Kovacs, B., Egedi, S., Bartfai, R., and Orban, L. 2001. Male-specific DNA markers from African catfish (*Clarias gariepinus*). Genetica, 110: 267~276
- Lee, B. Y., Penman, D. J., and Kocher, T. D. 2003. Identification of a sex-determining region in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using bulked segregant analysis. Anim. Genet. 34 (5) : 379~383
- Lee, B. Y., Hulata, G., and Kocher, T. D. 2004. Two unlinked loci controlling the sex of blue tilapia (*Oreochromis aureus*). Heredity, 92 (6) : 543~549
- Mair, G. C., Abucay, J. S., Skibinski, D. O. F., Abella, T. A., and Beardmore, J. A. 1997. Genetic manipulation of sex ratio for the large scale production of all-male tilapia *Oreochromis niloticus* L. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 54 (2) : 396~404
- Matsuda, M., Kusama, T., Oshiro, T., Kurihara, Y., Hamaguchi, S., and Sakaizumi, M. 1997. Isolation of a sex chromosome specific DNA sequence in the medaka, *Oryzias latipes*. Genes Genet. Syst. 72: 263~268
- Matsuda, M., Nagahama, Y., Shinomiya, A., Sato, T., Matsuda, C., Kobayashi, T., Morrey, C. E., Shibata, N., Asakawa, S., Shimizu, N., Hori, H., Hamaguchi, S., and Sakaizumi, M. 2002. DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. Nature, 417 (6 888): 559~563