

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20240321003

http://www.yykxjz.cn/

黄玉琴, 徐佳乐, 杨云生, 张健东, 黄建盛, 马骞, 谢瑞涛, 陈刚. 军曹鱼性别决定与分化相关基因的鉴别及表达模式分析. 渔业科学进展, 2025, 46(3): 01–11

HUANG Y Q, XU J L, YANG Y S, ZHANG J D, HUANG J S, XIE R T, MA Q, CHEN G. Sex determination and differentiation-related gene identification and expression pattern analysis in the cobia (*Rachycentron canadum*). Progress in Fishery Sciences, 2025, 46(3): 01–11

军曹鱼性别决定与分化相关基因的鉴别及表达模式分析*

黄玉琴^{1#} 徐佳乐^{1#} 杨云生¹ 张健东¹ 黄建盛¹
马骞^{1,2①} 谢瑞涛³ 陈刚^{1①}

(1. 广东海洋大学水产学院 广东 湛江 524088; 2. 广东省农业技术推广中心 广东 广州 510145;
3. 农业农村部华南水产与畜禽饲料重点实验室 广东 湛江 524000)

摘要 为探讨军曹鱼(*Rachycentron canadum*)性腺发育的调控机制,本研究从军曹鱼全基因组数据中筛选出5个与鱼类性别决定与分化相关的基因(*Amh*、*Cyp19a1b*、*Dmrt1*、*Gdf6a/6b*和*Sox9a/9b*),利用生物信息学方法对其进行染色体定位、共线性分析和系统进化分析,并利用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)分析各基因在军曹鱼成鱼各组织中的表达分布情况及在性腺成熟过程中的表达量变化模式。染色体定位结果显示,5个基因分别位于军曹鱼7条不同染色体上,不存在簇集现象。共线性分析结果显示,仅有军曹鱼*Amh*的共线性基因定位于XX/XY型鱼类的Y染色体上,其他基因均定位于常染色体上。系统进化分析结果显示,军曹鱼*Amh*、*Dmrt1*、*Cyp19a1b*和*Gdf6a*与鲷鱼(*Echeneis naucrates*)的亲缘关系最近,*Gdf6b*与日本花鲈(*Lateolabrax japonicus*)的亲缘关系最近,而*Sox9a*和*Sox9b*与高体鲷(*Seriola dumerili*)的亲缘关系最近。qRT-PCR结果显示,在军曹鱼Ⅲ~V期性腺中,5个基因在精巢中的表达量均极显著高于同时期卵巢($P<0.01$);此外,除*Sox9b*在性腺成熟过程中表达量显著降低,其余4个基因的表达水平均呈先显著升高而后显著降低的变化趋势。5个基因在不同组织的表达情况显示,*Amh*和*Dmrt1*仅在军曹鱼精巢中特异性表达,可能为军曹鱼雄性特异基因;*Gdf6a*和*Gdf6b*均在精巢和皮肤中高表达,可能为雄性偏向基因;*Cyp19a1b*、*Sox9a*和*Sox9b*在脑、皮肤和心脏等组织中均有不同程度的表达。上述结果表明,这些基因可能在军曹鱼精巢发育过程中发挥重要作用,相关研究结果可为揭示军曹鱼性腺发育的调控机制奠定基础。

关键词 军曹鱼; 性别; 性腺发育; 基因表达; 系统进化

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2025)03-0001-11

动物的性别决定是指个体发育成雌性或雄性的机制,主要取决于遗传型性别决定(genetic sex determination, GSD)、环境型性别决定(environmental sex determination, ESD)以及二者的共同作用(Hayes,

* 国家重点研发计划(2022YFD2401203)、广东省现代化海洋牧场适养品种核心技术攻关项目(2024-MRB-00-001)共同资助。#共同第一作者: 黄玉琴, Email: a13647776683@126.com; 徐佳乐, Email: 1352947804@qq.com

① 通信作者: 马骞, 副教授, Email: maq@gdou.edu.cn; 陈刚, 教授, Email: cheng@gdou.edu.cn

收稿日期: 2024-03-21, 收修改稿日期: 2024-04-29

1998)。性别分化则是以性别决定为前提,从未分化性腺发育成成熟精巢或卵巢的过程(Piferrer *et al.*, 2008)。在脊椎动物中,鱼类处于性别进化过程中的原始阶段,其性别决定与分化机制较为复杂。其中,GSD 又可以分为染色体决定机制(chromosomal SD)和多基因决定机制(polygenic SD)两种类型。其中,XX/XY 型、ZZ/ZW 型、ZO/ZZ 和 XX/XO 型等均是染色体决定机制中的常见类型;除此之外,还有部分鱼类,如斑马鱼(*Danio rerio*)等的性别是由基因组上多个基因联合,或由 1 对染色体上的多个等位基因累积效应所决定,因此称为多基因性别决定(Liew *et al.*, 2012)。由此可见,鱼类的性别决定不仅受到性染色体控制,同时也可能受到常染色体的影响(童金苟等, 2003)。环境型性别决定类型中,温度、光照及 pH 等均会对鱼类的性别产生直接或间接的影响。例如,温度会影响牙鲮(*Paralichthys lethostigma*)幼鱼的表型性别,当温度接近 23 °C 时雌性比例最高,而高温(>27 °C)则会使牙鲮产生雄性偏向的性别比例(雄性比例高达 94%) (Honeycutt *et al.*, 2019); 将鲷科(Sparidae)鱼类(*Pelvicachromis pulcher*)受精卵置于不同 pH 的水箱内处理 30 d,随后将 pH 恢复到标准值(pH 6.0)再饲养 330 d, pH 5.5 处理后的雄性性别比例显著高于 pH 6.5 组,表明 pH 变化亦能够改变养殖群体性别比例(Reddon *et al.*, 2013)。

近年来,随着各类生物技术的不断发展,已成功筛选并鉴定出部分与鱼类性别决定与分化相关的基因,例如 *Dmrt1* 作为目前已知的最保守的性别分化基因,是唯一同时参与脊椎和无脊椎动物性别决定的基因(Raymond *et al.*, 1998); *Sox9* 基因是 *Sox* 家族的一员,与鱼类雄性性别分化和精巢发育密切相关(路畅等, 2014); *Amh* (Liu *et al.*, 2022)、*Cyp19* (Tchoudakova *et al.*, 1998)、*Gdf6* (Reichwald *et al.*, 2015)等基因参与鱼类性别决定、性别分化和胚胎发育等过程。

军曹鱼(*Rachycentron canadum*)属鲈形目(Perciformes)、军曹鱼科(Rachycentridae)、军曹鱼属(Rachycentron),广泛分布于热带和亚热带水域,其生长速度快,具有广温广盐性,是我国南方重要的海水网箱养殖鱼类之一(Joan Holt *et al.*, 2007)。然而,目前关于军曹鱼性别决定与分化研究报道较为有限,在繁育过程中难以依靠外部形态对雌雄军曹鱼亲鱼进行性别鉴别,因此,亟需针对上述问题开展深入研究。已有研究表明,军曹鱼染色体核型中未发现异形性染色体(刘楚吾等, 2008),且其在生命周期中无性反转情况发生。此外,本团队亦针对军曹鱼早期性腺发育规律开展了系统研究,并检测了 *vasa* (Ma *et al.*, 2022)、

dnd (邝杰华等, 2022)等生殖细胞标记基因在性腺分化与发育过程中的表达情况。本研究基于前期获取的军曹鱼全基因组信息,从中查找出部分已报道的鱼类性别决定与分化相关基因,首先对其进行染色体定位和系统发育分析,随后利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)技术检测这些基因在军曹鱼成鱼的组织表达分布及其在不同发育期的性腺组织中的表达水平,旨在筛选出性别特异性表达的基因,为进一步探讨军曹鱼的性别决定及分化机制提供研究素材,并为军曹鱼性别标记的筛选提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用军曹鱼取自广东恒兴饲料实业股份有限公司 863 基地,实验用鱼经麻醉剂(丁香酚)麻醉后,首先进行生物学指标测量,随后立即解剖取出两叶性腺组织分开保存。同一尾鱼的其中一叶性腺放入冻存管后立即放入液氮罐中,随后转移至-80 °C 超低温冰箱保存,用于 qRT-PCR 检测;另一叶性腺放入 4%多聚甲醛(PFA)中固定 48 h 后转入 75%酒精中保存于-20 °C 冰箱,用于组织切片、HE 染色以进行性别和性腺分期鉴定。性腺分期的鉴定参照刘筠(1993)对鱼类性腺发育时期的划分标准。从中选取性腺发育时期为Ⅲ~Ⅴ期的雄鱼[体重为(1 753.31±575.02) g,体长为(55.41±5.71) cm]和雌鱼[体重为(2 167.07±1 254.63) g,体长为(58.72±5.10) cm]各 9 尾,用于性别决定与分化相关基因在军曹鱼性腺发育过程中的表达模式分析。此外,分别采集性腺发育为Ⅲ期的 3 尾雌鱼和 3 尾雄鱼,解剖并分离肝脏、脑、肌肉、皮肤、鳃、眼睛、头肾、体肾、胃、脾脏、心脏和肠道组织于液氮中速冻,随后转移至-80 °C 超低温冰箱,用于 qRT-PCR 检测各基因的组织表达分布情况。

1.2 总 RNA 提取与第一链 cDNA 合成

组织样品在液氮中快速研磨后,以 Trizol 法抽提总 RNA,通过超微量核酸蛋白测定仪(Biochrom)检测总 RNA 的浓度和纯度,并用 1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。分别以提取的总 RNA 各 3 μg 为模板,采用 EasyScript One-step cDNA Synthesis 试剂盒(北京全式金生物有限公司)反转录合成第一链 cDNA。

1.3 引物的设计和验证

从课题组前期获得的军曹鱼全基因组数据(PRJNA634421)中筛选出 5 个鱼类性别决定与分化候

选基因(*Cyp19a1b*、*Dmrt1*、*Amh*、*Gdf6a/6b* 和 *Sox9a/9b*), 利用 Premier Primer 6.0 设计用于 qRT-PCR 的特异性引物(表 1), 产物片段为 80~200 bp。

表 1 5 个性别决定与分化相关基因的特异性引物
Tab.1 Specific primers for five genes related to sex determination and differentiation

基因名 Gene name	引物序列 Primer sequence (5'~3')	产物大小 Product size/bp
<i>Cyp19a1b</i>	ACACTCTGTCCATCAGCCTCTTC AGCGTTCATCTCCTCCACTATCC	89
<i>Dmrt1</i>	CGGAGGTGATGGTGAAGAACGAAG TGGAGGACGACGCTGAGTGAC	129
<i>Amh</i>	CCAGAGCAGACCCCAGTAAC TTGATGTTGGCGGTGTTTGG	106
<i>Sox9a</i>	CCGGACTACAAGTACCAGCC ATTGGGGGAAATGTGCGTCT	96
<i>Sox9b</i>	CTGAGCCCCAGTCACTACAG TGAGCCTTGACCATGCG	177
<i>Gdf6a</i>	GGGTCACTCTGGGCAAATCA GCTTCCTCCTTCTCTCCGAC	187
<i>Gdf6b</i>	GATCTCCACCACTTCGCTTTG TCTGTCGATGGAAGCTGGC	174
<i>β-actin</i>	AGGGAAATTGTGCGTGAC AGGCAGCTCGTAGCTCTT	100

1.4 性别决定与分化相关基因染色体定位及共线性分析

基于军曹鱼全基因组测序数据获取 5 个性别决定与分化相关基因的染色体定位信息, 利用 TBtools 软件对其进行染色体定位。从 NCBI 数据库中下载 XX/XY 型的日本青鳉(*Oryzias latipes*)和尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)、ZZ/ZW 型的半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)和奥利亚罗非鱼(*Oreochromis aureus*)、多基因性别决定的斑马鱼的全基因组和基因注释文件, 利用 TBtools 软件中的 MCScanX 插件对军曹鱼及上述鱼类的 5 个性别决定与分化相关基因进行物种间共线性分析。

1.5 性别决定与分化相关基因的系统进化分析

利用 DNAMAN 软件分别将 5 个基因的核酸序列翻译为氨基酸序列, 使用 NCBI 数据库上的 Protein BLAST 对氨基酸序列进行比对, 分别下载其他硬骨鱼类及高等脊椎动物的氨基酸序列, 利用 MEGA 11 软件, 以邻接法(neighbour-joining, NJ)构建系统进化树, 针对进化树各分支结点均进行 1 000 次重复计算检验。

1.6 性别决定与分化相关基因在军曹鱼成鱼各组织及性腺发育过程中的表达

以军曹鱼成鱼不同组织和各期性腺的 cDNA 为模板, 以 *β-actin* 为内参基因, qRT-PCR 实验体系及

流程按照 SYBR® Premix Ex Taq™ 试剂盒(北京全式金生物有限公司)说明书进行操作。其中, qRT-PCR 反应体系 10 μL, PCR 程序: 94 ℃ 30 s, 94 ℃ 5 s, 59 ℃ 15 s, 72 ℃ 10 s, 45 个循环, 每个实验样品设置 3 个重复, 使用实时荧光定量 PCR 仪(Light Cycler96®, Roche)检测各基因在不同组织和各期性腺中的表达水平。依据每个样本的 *Ct* 值, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法对数据进行处理, 计算各基因的相对表达量, 数据结果均以平均值±标准差(Mean±SD)表示。采用 SPSS 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA), $P<0.05$ 为差异显著, $P<0.01$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 军曹鱼性腺发育分期的鉴定

军曹鱼性腺组织切片如图 1 所示, 精巢处于Ⅲ期时(图 1a), 精巢呈白色长条状, 精小叶散布于整个精巢中, 精小囊内可见大量初级精母细胞和次级精母细胞; Ⅳ期(图 1b), 精巢白色长条状, 精小叶的形状逐渐变得狭长, 呈块状密集分布, 精小囊以次级精母细胞为主, 精小叶腔中充斥精细胞, 部分精细胞已开始变态为精子; Ⅴ期(图 1c), 精巢体积达到最大, 精小叶变得更为狭长, 从精巢中央向边缘呈辐射状分布, 大部分精细胞已变态为精子, 可观察到密集的精细胞与成熟精子充满整个精小叶腔。

卵巢处于Ⅲ期时(图 1d), 卵巢呈微黄的粗棒状, 表面可见密布的血管, 此时卵巢中出现Ⅲ时相的卵母

细胞,细胞膜内缘出现液泡并向细胞核逐渐充满细胞质,细胞核边缘出现油滴,并向细胞质外缘扩增,卵母细胞已经具有两层滤泡膜;IV期(图1e),卵巢淡黄色,以IV时相卵母细胞为主,卵母细胞体积不断增大,细胞质中逐渐充满卵黄颗粒,油滴充满于细胞质中,

核膜逐渐内褶直至消失;V期(图1f),细胞核出现极化现象,移向动物极,随后核膜破裂,核物质分散在细胞质中,细胞核分解消失,细胞内充满卵黄颗粒和油滴,卵巢以富含卵黄物质的第V时相卵母细胞为主。

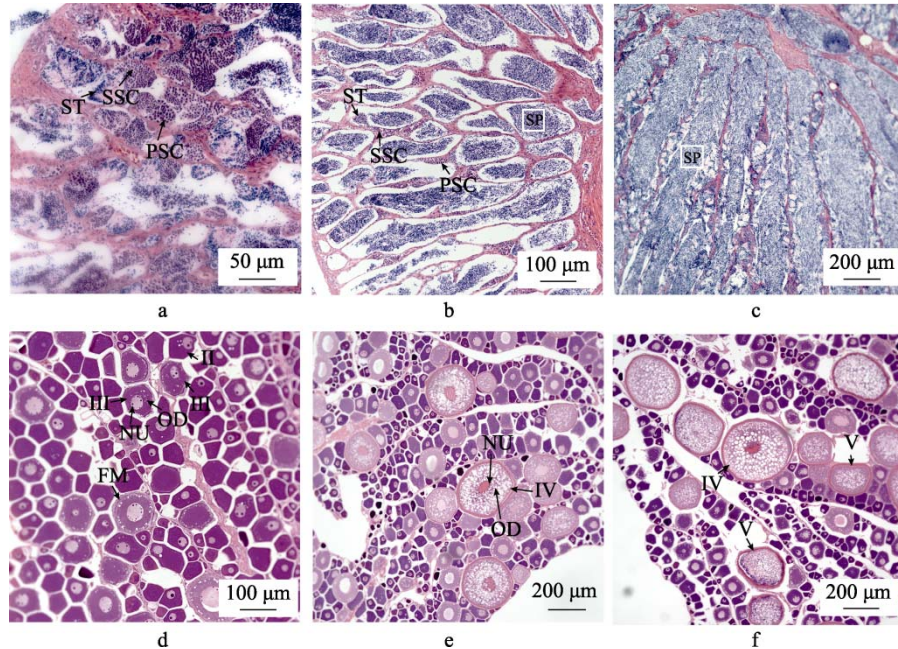


图1 军曹鱼性腺组织学观察

Fig.1 Histological observations on the gonads of *R. canadum*

PSC: 初级精母细胞; SSC: 次级精母细胞; ST: 精细胞; SP: 精子; NU: 核仁; OD: 油滴; FM: 滤泡膜;

Ⅲ: 第Ⅲ时相卵母细胞; IV: 第Ⅳ时相卵母细胞; V: 第Ⅴ时相卵母细胞

PSC: Primary spermatocyte; SSC: Secondary spermatocyte; ST: Spermatid; SP: Spermatozoa; NU: Nucleolus; OD: Oil droplet; FM: Follicular membrane; Ⅲ: Oocyte at Stage Ⅲ; IV: Oocyte at Stage IV; V: Oocyte at Stage V

2.2 性别决定与分化相关基因的染色体定位及共线性分析

如图2所示,军曹鱼 *Amh*、*Cyp19a1b* 和 *Dmrt1* 分别位于 Chr7、Chr10 和 Chr8 上, *Gdf6a* 和 *Gdf6b* 分别位于 Chr4 和 Chr16 上, *Sox9a* 和 *Sox9b* 分别位于 Chr21 和 Chr19 上。

共线性分析结果如图3所示,军曹鱼 *Gdf6a*、*Amh*、*Cyp19a1b* 与 XX/XY 型的日本青鲈和尼罗罗非鱼、ZZ/ZW 型的半滑舌鲷和奥利亚罗非鱼、多基因性别决定的斑马鱼等鱼类存在共线性关系。其中,位于军曹鱼 Chr4 上的 *Gdf6a* 与斑马鱼(Chr16 和 Chr19)、日本青鲈(Chr11 和 Chr16)、尼罗罗非鱼(Chr11 和 Chr22)、半滑舌鲷(Chr13 和 Chr18)、奥利亚罗非鱼(Chr11 和 Chr22)存在共线性关系;位于军曹鱼 Chr7 上的 *Amh* 与斑马鱼 Chr22、日本青鲈和尼罗罗非鱼 Y 染色体、半滑舌鲷 Chr2、奥利亚罗非鱼 Chr23 存在共线性关

系;位于军曹鱼 Chr10 上的 *Cyp19a1b* 与日本青鲈 Chr6、尼罗罗非鱼 Chr7、半滑舌鲷 Chr6 和奥利亚罗非鱼的 Chr7 存在共线性关系。

由于军曹鱼 *Amh* 基因与 XX/XY 型鱼类(尼罗罗非鱼和日本青鲈)存在共线性(并且该基因位于 Y 染色体上),因此,对军曹鱼与尼罗罗非鱼和日本青鲈的染色体进行共线性分析(图4),结果表明,军曹鱼的 Chr7 与 2 种 XX/XY 型鱼的 Y 染色体具备同源性。

2.3 性别决定与分化相关基因系统进化分析

系统进化分析结果显示,5 个基因各自聚为一簇(*Sox9a* 和 *Sox9b* 聚为一簇, *Gdf6a* 和 *Gdf6b* 聚为一簇),各基因簇中硬骨鱼类均形成单独分支,独立于其他高等脊椎动物之外(图5)。军曹鱼 *Amh*、*Dmrt1*、*Cyp19a1b* 和 *Gdf6a* 与鲕鱼(*Echeneis naucrates*)的亲缘关系最近, *Gdf6b* 与日本花鲈(*Lateolabrax japonicus*)的亲缘关系最近, *Sox9a* 和 *Sox9b* 与高体鲷(*Seriola dumerili*)

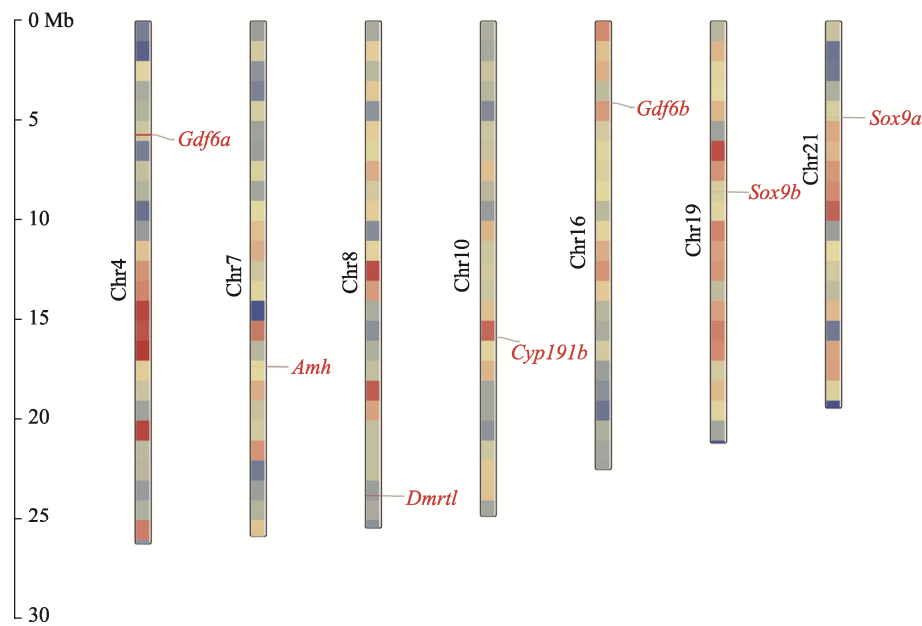


图 2 5 个性别决定与分化相关基因在军曹鱼染色体上的定位
Fig.2 Localization of five genes related to sex determination and differentiation on the chromosomes of *R. canadum*

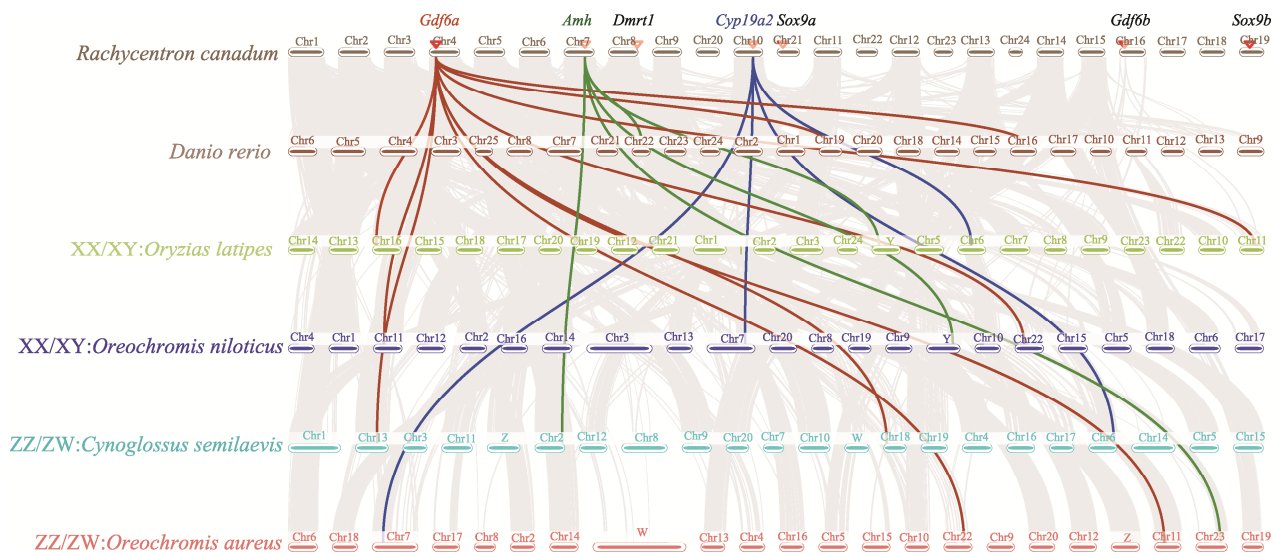


图 3 5 个性别决定与分化相关基因在军曹鱼与其他硬骨鱼类基因组间的共线性分析
Fig.3 Analysis of covariance of five sex determination and differentiation-related genes between genomes of *R. canadum* and other teleosts

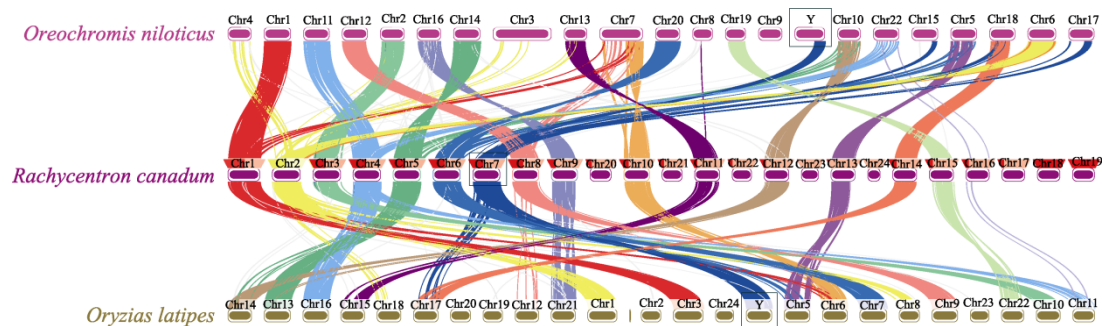


图 4 军曹鱼与 XX/XY 型鱼类(尼罗罗非鱼与日本青鳉)染色体间共线性分析
Fig.4 Analysis of covariance between the chromosome of *R. canadum* and XX/XY-type fishes (*O. niloticus* and *O. latipes*)

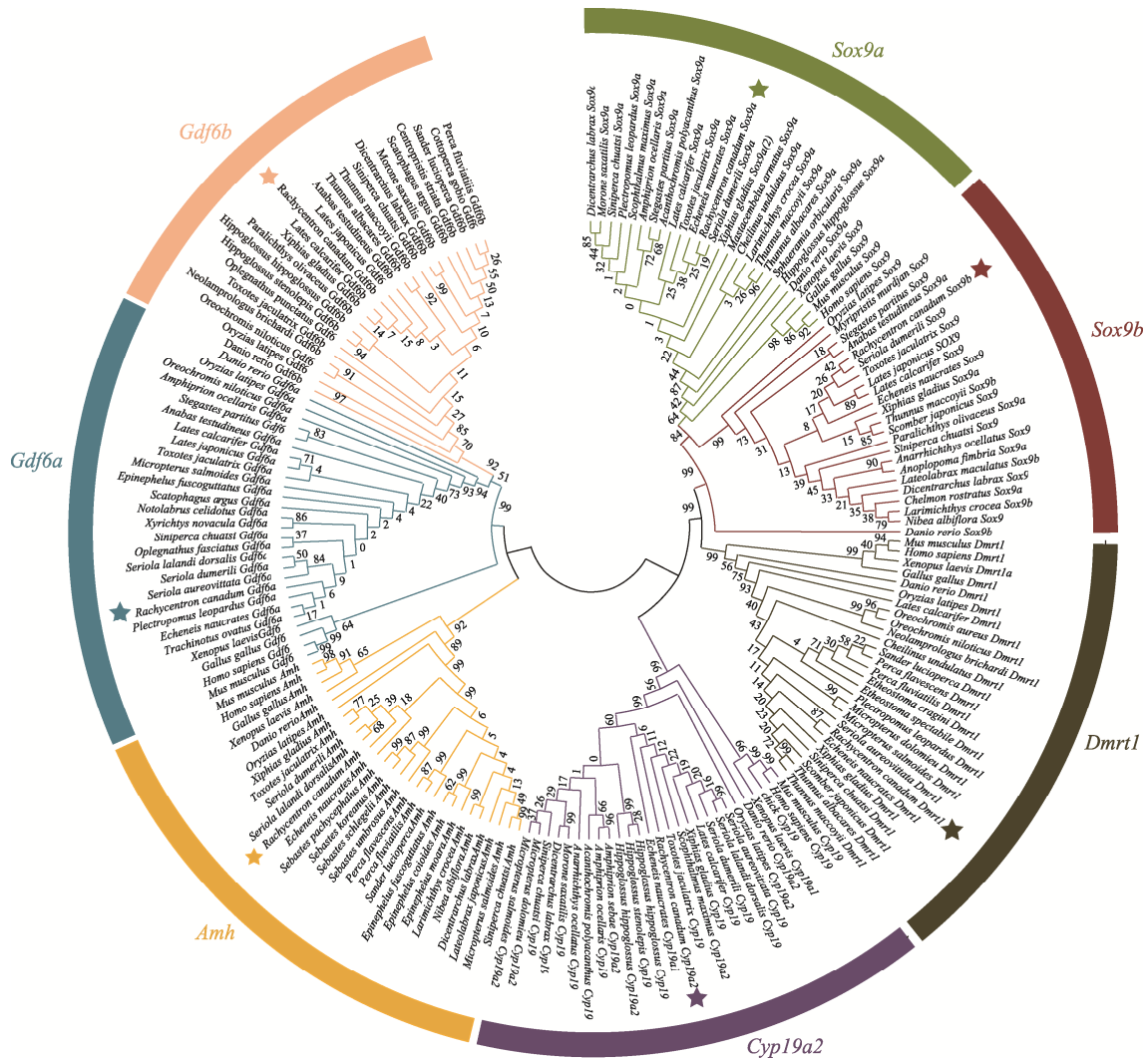


图5 基于NJ法构建的系统进化树

Fig.5 Phylogenetic tree constructed based on the neighbor-joining (NJ) method

图中不同颜色表示不同基因, 星号表示军曹鱼基因

Different colors in the diagram indicate different genes, and asterisks indicate genes in the *R. canadum*

的亲缘关系最近。

2.4 性别决定与分化相关基因在军曹鱼性腺成熟过程中的表达情况

如图6所示, 5个基因在军曹鱼Ⅲ~V期卵巢中的表达量极低, 在精巢中的表达量均显著高于同时期卵巢($P<0.01$)。在性腺成熟过程中, *Cyp19a1b*、*Amh*、*Sox9a*、*Gdf6a*、*Gdf6b*和*Dmrt1*的表达量均在Ⅳ期显著升高至最大值后显著降低($P<0.05$), *Sox9b*的表达量则持续显著降低($P<0.05$)。

2.5 性别决定与分化相关基因在军曹鱼不同组织的表达情况

5个基因在14个不同组织的表达分布情况如图7

所示, 军曹鱼 *Amh* 和 *Dmrt1* 仅在精巢中特异性表达, 其他3个基因在性腺之外的其他组织, 如心脏、脑和皮肤等组织有不同程度的表达。例如, *Gdf6a* 在精巢中的表达量最高, 其次为皮肤; *Gdf6b* 在皮肤中的表达量最高, 其次为精巢; *Cyp19a1b* 在脑中表达量最高, 其次是心脏; *Sox9a* 在心脏中表达量最高, 其次是皮肤, *Sox9b* 在脑中表达量最高, 其次是皮肤和心脏。

3 讨论

军曹鱼与其他不同染色体核型的硬骨鱼类基因共线性分析结果显示, 5个性别决定与分化相关基因中, 仅有军曹鱼 *Amh* 的共线性基因定位于 XX/XY 型鱼类的 Y 染色体上, 其他基因均定位于常染色体。

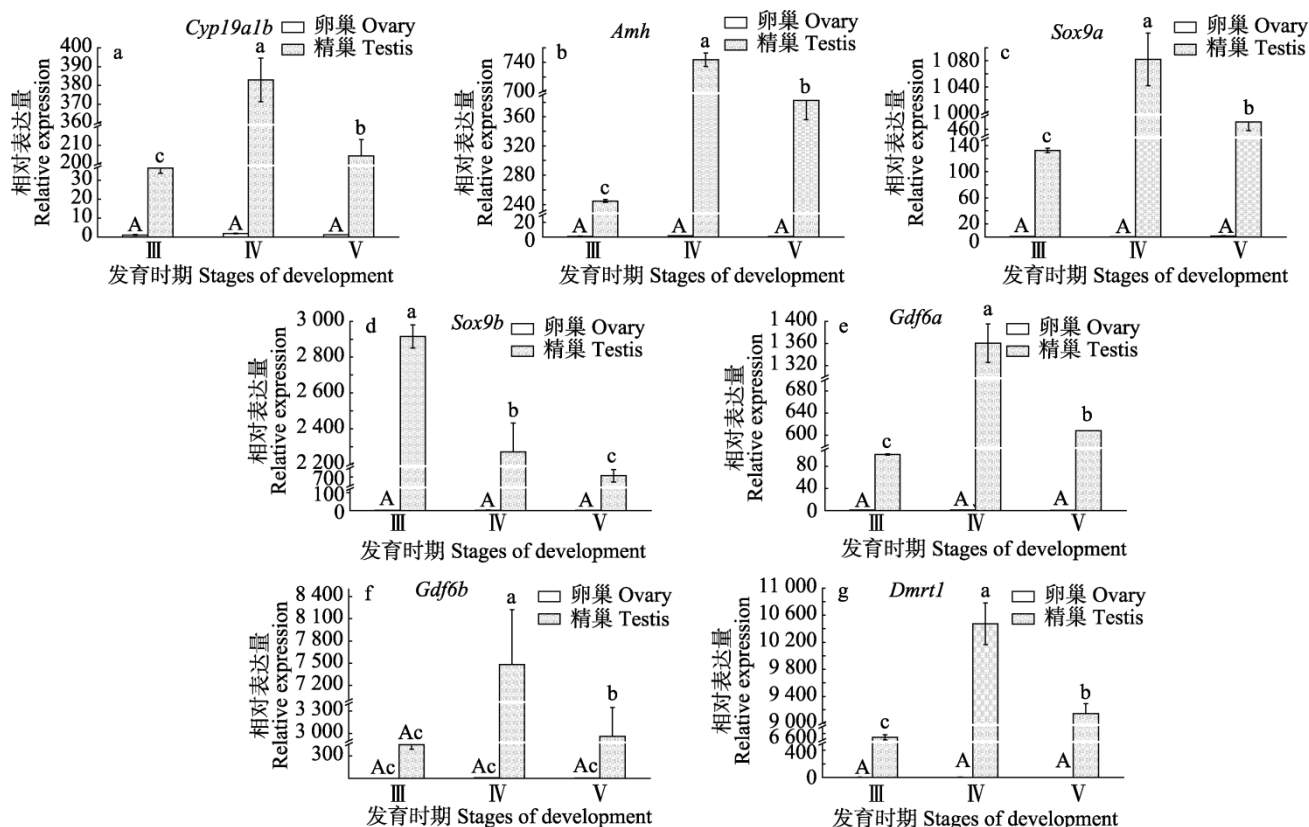


图6 性别决定与分化相关基因在军曹鱼 III~V 期性腺中的表达情况

Fig.6 Expression of sex-determination and differentiation-related genes in stage III~V gonads of *R. canadum*

上标不同字母表示同一基因在性腺发育不同时期的表达量具有显著性差异($P < 0.05$), 其中, 卵巢用大写字母, 精巢用小写字母。

Different letters in the superscript indicate significant differences in gene expression at different stages of gonad development ($P < 0.05$), where the ovaries are in capital letters and the spermathecae in lower case letters.

共线性是指在一个物种的基因组中相互连锁的基因, 在另一物种的基因组中也是连锁关系, 而且在 2 个物种的遗传图上的位置也是相同的。在 XX/XY 型鱼类如尼罗罗非鱼的研究中, *Amh/Amhy* 是尼罗罗非鱼的主性别决定基因, *Amh* 基因的 II 型受体(*Amhr II*)也是尼罗罗非鱼雄性性别决定的关键因子, 与同为 XX/XY 型的青鳉存在明显的共线性关系, 二者存在相似的基因座位(赵九娥, 2015)。为了探索军曹鱼 Chr7 上的 *Amh* 与 Y 染色体之间的关系, 本研究对军曹鱼和 2 种 XX/XY 型鱼类(尼罗罗非鱼与日本青鳉)进行染色体间的共线性分析, 结果表明, 军曹鱼 Chr7 与 XX/XY 型鱼类 Y 染色体之间具备同源性。

5 个性别决定与分化相关基因中, *Amh* 与鱼类的生殖细胞增殖和生殖能力有关, 并且在性腺中高表达(Liu et al, 2022)。本研究显示, 军曹鱼 *Amh* 仅在精巢中特异性表达, 这一结果与双须骨舌鱼(*Osteoglossum bicirrostum*)(王且鲁等, 2016)和牙鲆(Wang et al, 2020)中的研究结果相似, 进一步证实了 *Amh* 可能在无性

染色体鱼类雄性性腺发育中的调控作用。对于具有性染色体的鱼类如 XX/XY 型的大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)(李兵部等, 2023)和 ZZ/ZW 型的半滑舌鳎(刘姗姗, 2013)中, *Amh* 分别位于 Y 染色体和 Chr2 上, 且该基因在精巢的表达量显著高于其他组织; 对于无异型性染色体的鱼类如斑马鱼, *Amh* 位于其 Chr22 上, 具有抑制精原细胞过度增殖、促进生殖细胞分化的功能(林桥洪, 2020)。军曹鱼 *Amh* 位于 Chr7, 该染色体与上述 *Amh* 定位的染色体之间均存在共线性, 表明该基因在各性别决定类型鱼类的精巢分化和发育均具有重要作用。

已有研究表明, *Dmrt1* 在鱼类雄性性别决定及精巢发育过程中具有重要作用。例如: 对于具有性染色体的鱼类如 XX/XY 型的金钱鱼(*Scatophagus argus*)(Mustaphha et al, 2018)、ZZ/ZW 型的半滑舌鳎(孙业盈等, 2008)及无异型性染色体的斑马鱼(郭一清, 2006)等鱼类, *Dmrt1* 分别位于 Y、Z 染色体和 Chr5 上且在精巢中特异性高表达; 此外, *Dmrt1* 作为胡子鲇(*Clarias*

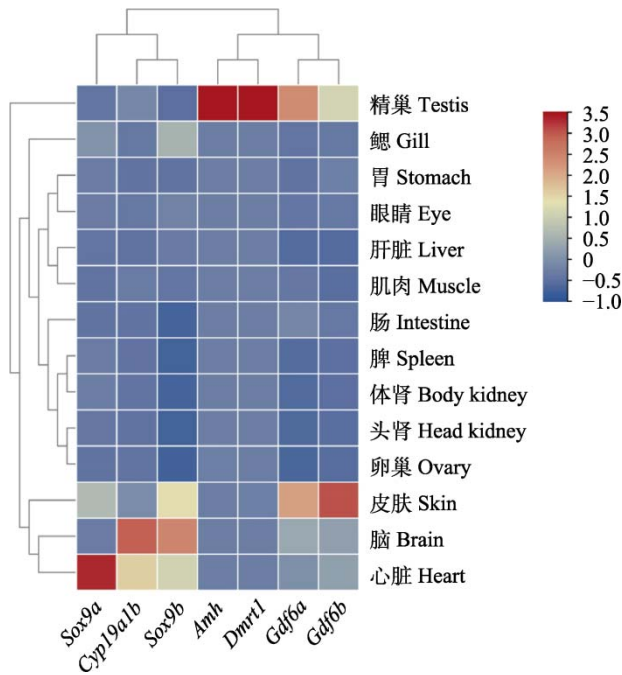


图 7 性别决定与分化相关基因在军曹鱼不同组织中的表达情况

Fig.7 Expression of sex-determination and differentiation-related genes in different tissues of *R. canadum*

fuscus)(邓思平等, 2012)精巢特异性表达基因, 已被证明可能与胡子鲇的雄性性别决定、精子发生及精巢发育密切相关; 相似地, 军曹鱼 *Dmrt1* 在精巢中特异性表达, 且定位于 Chr8。综上推测, *Amh* 和 *Dmrt1* 在军曹鱼的精巢发育过程中具有重要作用, 可作为后续性腺发育调控机制研究的目标基因。

Gdf6 基因是生长和分化因子家族(GDFs)中的一员, 又称为骨形态发生蛋白 13(BMP13), *Gdf6* 在 Y 染色体上的复制基因 *Gdf6y* 为鲮鱼(*Nothobranchius furzeri*)(Reichwald *et al.*, 2015)的性别决定候选基因; 而 *Gdf6a* 是丝尾鳢(*Hemibagrus wyckiioides*)(魏文玉, 2023)的雄性偏向表达基因, 在精巢中具有较高的表达水平, 可能参与调节丝尾鳢的性腺分化和发育过程; 尼罗罗非鱼成鱼 8 个组织的转录组测序结果表明, *Gdf6b* 主要在精巢中表达(龙娟, 2019)。本研究, 军曹鱼 *Gdf6a/6b* 在精巢中的表达量显著高于其他组织, 由此可推测, *Gdf6a/6b* 作为雄性偏向表达基因可能参与调节军曹鱼精巢的分化及发育。

Sox9 基因与上述 *Amh* 和 *Dmrt1* 相比, 其在鱼类的各组织中具有更为广泛的表达分布。例如, 在金钱鱼中, *Sox9* 在各组织中均有表达, 其中, 在脑、鳍和精巢中有较高的表达量(陈建华等, 2015); 在半滑舌鳎中, *Sox9* 在雄鱼的脑、垂体和精巢中的表达量均显

著高于雌鱼(Dong *et al.*, 2011); 圆斑星鲈(*Verasper variegatus*) *Sox9* 基因同样具有较广泛的组织表达分布, 且精巢中的表达量显著高于卵巢(张乐乐等, 2018)。同样地, 军曹鱼 *Sox9a/9b* 在脑、心脏和皮肤中具有较高的表达量, 且精巢中的表达量显著高于卵巢。由此可推测, *Sox9* 除了可能参与雄性性别分化和精巢发育(路畅等, 2014)之外, 还有可能在神经分化和发育中发挥作用。

本研究结果表明, *Amh* 和 *Dmrt1* 仅在军曹鱼精巢中特异性表达, 其他 3 个基因在精巢中的表达量亦显著高于卵巢, 由此可推测, 上述基因在军曹鱼的精巢发育过程中可能具有重要作用。

军曹鱼精巢发育过程可分为 6 个时期, 分别为 I 期(精原细胞增殖期)、II 期(精母细胞增长期)、III 期(精母细胞成熟期)、IV 期(精细胞变态期)、V 期(精子成熟期)、VI 期(精子退化吸收期)(邝杰华, 2021)。本研究中, 军曹鱼 *Cyp19a1b*、*Amh*、*Sox9a*、*Gdf6a*、*Gdf6b* 和 *Dmrt1* 在 IV 期精巢(精细胞变态期)的表达量最高, 表明其可能参与调控精巢的成熟过程。此外, 其他鱼类中也发现相似的结果。例如, 在胡子鲇精巢发育过程中, *Dmrt1* 在 IV 期中的表达量显著高于 III 期和 V 期(邓思平等, 2012)。此外, 性别决定与分化基因在鱼类性腺发育各时期表达水平的显著差异也多有报道。如, 许氏平鲈(*Sebastes schlegeli*) *Cyp19a1b* 在 IV~V 期精巢中的表达量显著高于其他时期(杨艳平等, 2012); 牙鲆 *Amh* 仅在 I~IV 期精巢中高表达, 显示 *Amh* 可能参与调节精巢的早期发育(Wang *et al.*, 2020); 在黄颡鱼(*Pseudobagrus fulvidraco*)中, *Sox9a1* 在 II 期精巢的表达量显著高于 IV 期和 V 期(徐跑, 2006); 本研究中, 军曹鱼 *Sox9b* 在 III 期(精母细胞成熟期)的表达量显著高于 IV 期和 V 期。由此可推测, 上述基因可能在性腺发育过程中的特定阶段发挥更为显著的作用。

参 考 文 献

- CHEN J H, HE M X, MU X J, *et al.* cDNA cloning and mRNA expression analysis of Sox9 in *Scatophagus argus*. Chinese Journal of Zoology, 2015, 50(1): 93–102 [陈建华, 何毛贤, 牟幸江, 等. 金钱鱼 Sox9 cDNA 克隆及其表达分析. 动物学杂志, 2015, 50(1): 93–102]
- DENG S P, WANG J J, WU T L, *et al.* cDNA cloning and expression analysis of Dmrt1 in *Clarias fuscus*. Acta Hydrobiologica Sinica, 2012, 36(4): 610–617 [邓思平, 王静杰, 吴天利, 等. 胡子鲇 Dmrt1 基因全长 cDNA 克隆及其表达分析. 水生生物学报, 2012, 36(4): 610–617]
- DONG X L, CHEN S L, JI X S, *et al.* Molecular cloning,

- characterization and expression analysis of Sox9a and Foxl2 genes in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Acta Oceanologica Sinica*, 2011, 30(1): 68–77
- GUO Y Q. Molecular cloning and expression of Dmrt1 and Dmrt5 genes of zebrafish. Doctoral Dissertation of Wuhan University, 2004 [郭一清. 斑马鱼 Dmrt1 和 Dmrt5 基因克隆和表达分析. 武汉大学博士研究生学位论文, 2004]
- HAYES T B. Sex determination and primary sex differentiation in amphibians: Genetic and developmental mechanisms. *Journal of Experimental Zoology*, 1998, 281(5): 373–399
- HONEYCUTT J L, DECK C A, MILLER S C, *et al.* Warmer waters masculinize wild populations of a fish with temperature-dependent sex determination. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 6527
- JOAN HOLT G, FAULK C K, SCHWARZ M H. A review of the larviculture of cobia *Rachycentron canadum*, a warm water marine fish. *Aquaculture*, 2007, 268(1/2/3/4): 181–187
- KUANG J H, MA Q, CHEN G, *et al.* Cloning and expression analysis of *dnd* during annual gonadal development of cobia(*Rachycentron canadum*). *Progress in Fishery Sciences*, 2022, 43(2): 119–128 [邝杰华, 马骞, 陈刚, 等. 军曹鱼 *dnd* 基因 cDNA 克隆及其在性腺周年发育过程中的表达. 渔业科学进展, 2022, 43(2): 119–128]
- KUANG J H. Studies on early life history, gonadal development and expression patterns of germ cell marker genes in cobia (*Rachycentron canadum*). Master's Thesis of Guangdong Ocean University, 2021 [邝杰华. 军曹鱼早期生长和性腺发育特征及生殖细胞标记基因表达模式研究. 广东海洋大学硕士研究生学位论文, 2021]
- LI B B, CAO Z M, TAO Y F, *et al.* Molecular cloning, expression analysis and polyclonal antibody preparation of anti-Müllerian hormone (*amh*) gene in largemouth bass *Micropterus salmoides*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2023, 47(5): 775–785 [李兵部, 曹哲明, 陶易凡, 等. 大口黑鲈 *amh* 基因全长 cDNA 克隆、表达及多克隆抗体制备. 水生生物学报, 2023, 47(5): 775–785]
- LIEW W C, BARTFAI R, LIM Z, *et al.* Polygenic sex determination system in zebrafish. *PLoS One*, 2012, 7(4): e34397
- LIN Q H. Functional analysis of *amh* and *dmrt1* in germ cell development and sex differentiation of zebrafish. Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2020 [林桥洪. *amh* 和 *dmrt1* 在斑马鱼生殖细胞发育和性别分化中的功能研究. 华中农业大学博士研究生学位论文, 2020]
- LIU C W, CAO F J. Studies on the karyotypes of *Rachycentron canadum*. *Marine Sciences*, 2008, 32(1): 29–31 [刘楚吾, 曹伏君. 军曹鱼染色体组型分析. 海洋科学, 2008, 32(1): 29–31]
- LIU S S. Anti-mullerian hormone gene of the half-smooth tongue-sole (*Cynoglossus semilaevis*): Cloning and its mRNA expression. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2013 [刘姗姗. 半滑舌鲷 AMH 基因的克隆及表达分析. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2013]
- LIU X Y, DAI S F, WU J H, *et al.* Roles of anti-Müllerian hormone and its duplicates in sex determination and germ cell proliferation of Nile *Tilapia*. *Genetics*, 2022, 220(3): iyab237
- LIU Y. Propagation physiology of main cultivated fish in China. Beijing: Agriculture Press, 1993 [刘筠. 中国养殖鱼类繁殖生理学. 北京: 农业出版社, 1993]
- LONG J. Bioinformatic analysis of TGF- β signaling pathway members and their expression in Nile *Tilapia*. Master's Thesis of Southwest University, 2019 [龙娟. TGF- β 信号通路成员生物信息学分析及其在尼罗罗非鱼中的表达研究. 西南大学硕士研究生学位论文, 2019]
- LU C, SU L N, ZHU B K. Advances on the genes related with sex determination and differentiation of fish. *Hubei Agricultural Sciences*, 2014, 53(13): 2981–2986 [路畅, 苏利娜, 朱邦科. 鱼类性别决定及分化相关基因研究进展. 湖北农业科学, 2014, 53(13): 2981–2986]
- MA Q, KUANG J H, CHEN G, *et al.* Cloning and expression profiling of the gene Vasa during first annual gonadal development of cobia (*Rachycentron canadum*). *Fishes*, 2022, 7(2): 60
- 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*). *Aquaculture*, 2018, 495: 351–358
- PIFERRER F, GUIGUEN Y. Fish gonadogenesis. part II: Molecular biology and genomics of sex differentiation. *Reviews in Fisheries Science*, 2008, 16(sup1): 35–55
- RAYMOND C S, SHAMU C E, SHEN M M, *et al.* Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. *Nature*, 1998, 391(6668): 691–695
- REDDON A R, HURD P L. Water pH during early development influences sex ratio and male morph in a West African cichlid fish, *Pelvicachromis pulcher*. *Zoology*, 2013, 116(3): 139–143
- REICHWALD K, PETZOLD A, KOCH P, *et al.* Insights into sex chromosome evolution and aging from the genome of a short-lived fish. *Cell*, 2015, 163(6): 1527–1538
- SUN Y Y, ZHANG Q Q, QI J, *et al.* Cloning and expression analysis of DMRT1 gene in *Cynoglossus semilaevis*. *Journal of Wuhan University (Natural Science)*, 2008, 54(2): 221–226 [孙业盈, 张全启, 齐洁, 等. 半滑舌鲷 DMRT1 基因的克隆与表达分析. 武汉大学学报(理学版), 2008, 54(2): 221–226]
- TCHOUDAKOVA A, CALLARD G V. Identification of multiple CYP19 genes encoding different cytochrome P450 aromatase isozymes in brain and ovary. *Endocrinology*, 1998, 139(4): 2179–2189
- TONG J G, ZHU J H, GUAN H S. A mini-review of studies on genetic basis of sex determination in fish. *Journal of Fisheries of China*, 2003, 27(2): 169–176 [童金苟, 朱嘉濠, 关海山. 鱼类性别决定的遗传基础研究概况. 水产学报,

- 2003, 27(2): 169–176]
- WANG Q L, LIU Y, SONG H M, *et al.* Molecular cloning, expression pattern and prokaryotic expression of anti-Müllerian hormone (*amh*) gene in *Osteoglossum bicirrostum*. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(12): 1801–1812 [王且鲁, 刘奕, 宋红梅, 等. 双须骨舌鱼抗缪勒氏管激素基因 *amh* 的克隆、组织表达分析和原核表达. 水产学报, 2016, 40(12): 1801–1812]
- WANG W X, LIANG S S, ZOU Y X, *et al.* Amh dominant expression in Sertoli cells during the testicular differentiation and development stages in the olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Gene, 2020, 755: 144906
- WEI W Y. Screening and preliminary functional studies of genes associated with sex determination and differentiation in red-tail catfish (*Hemibagrus wyckioides*). Master's Thesis of Dalian Ocean University, 2023 [魏文玉. 丝尾鲮性别决定和分化相关基因的筛选和功能初步研究. 大连海洋大学硕士研究生学位论文, 2023]
- XU P. Study on sex related genes Sox9, ftz-F1, and P450arom in yellow catfish, *Pelteobagrus fulvidraco*. Doctoral Dissertation of Nanjing Agricultural University, 2006 [徐跑. 黄颡鱼性别相关基因 Sox9、Ftz-F1 和 P450arom 的研究. 南京农业大学博士研究生学位论文, 2006]
- YANG Y P, WEN H S, SHI D, *et al.* Cloning and the expression analysis of CYP19B gene cDNA during the reproductive cycle of *Sebastes schlegeli*. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2012, 43(2): 370–375 [杨艳平, 温海深, 史丹, 等. 许氏平鲈(*Sebastes schlegeli*)CYP19B 基因 cDNA 克隆及在生殖周期中的表达分析. 海洋与湖沼, 2012, 43(2): 370–375]
- ZHANG L L, BIAN L, CHANG Q, *et al.* Cloning and expression of the *sox9* gene in spotted halibut (*Verasper variegatus*). Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(6): 72–80 [张乐乐, 边力, 常青, 等. 圆斑星鲽 *sox9* 基因的克隆与表达. 渔业科学进展, 2018, 39(6): 72–80]
- ZHAO J E. The role of *amhy/amh* and their receptor *amhr II* in Nile *Tilapia* male sex determination. Master's Thesis of Southwest University, 2015 [赵九娥. *Amhy/Amh* 及其受体 *Amhr II* 对尼罗罗非鱼雄性性别的决定作用. 西南大学硕士研究生学位论文, 2015]

(编辑 冯小花)

Sex Determination and Differentiation-Related Gene Identification and Expression Pattern Analysis in the Cobia (*Rachycentron canadum*)

HUANG Yuqin^{1#}, XU Jiale^{1#}, YANG Yunsheng¹, ZHANG Jiandong¹,
HUANG Jiansheng¹, MA Qian^{1,2①}, XIE Ruitao³, CHEN Gang^{1①}

(1. College of Fisheries, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;

2. Agro-Tech Extension Center of Guangdong Province, Guangzhou 510145, China;

3. Key Laboratory of Aquatic, Livestock and Poultry Feed Science and Technology in South China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Zhanjiang 524000, China)

Abstract While sex determination in animals refers to the mechanism by which individuals develop into females or males, it presents the process by which undifferentiated gonads develop into mature testes or ovaries, with sex determination as a prerequisite. Among vertebrates, fish are at a primitive stage in the process of sex evolution, and their sex-determining mechanisms are primitive, diverse, and variable, and share the sex-determining modalities of all vertebrates. The mechanisms of sex determination in fish are complex and diverse, including genetic sex determination (GSD), environmental sex determination (ESD), or a combination of both. Among them, GSD can be subdivided into two types: chromosomal sex determination and polygenic sex determination. Chromosomal sex determination is the main sex-determining (SD) gene located on the sex chromosomes that determines the sex of the offspring; whereas polygenic sex determination is the combination of multiple genes on the genome or the cumulative effect of multiple alleles on a pair of

① Corresponding author: MA Qian, Email: maq@gdou.edu.cn; CHEN Gang, Email: cheng@gdou.edu.cn

chromosomes determining the sex of the offspring; virtually all are the result of the direct or indirect action of genes.

The cobia (*Rachycentron canadum*) is an important seawater net-pen cultured fish species in southern China. No heteromorphic sex chromosomes exist in the chromosomal karyotype of cobia, and there are no associated sex markers to distinguish between males and females. Furthermore, the sex determination and differentiation of cobia is limited, and it is difficult to rely on the external morphology of cobia to differentiate the sexes of male and female cobia parents during the breeding process. In this study, based on the whole genome information of cobia obtained in the previous period, some reported fish sex determination and sex differentiation related genes (*Amh*, *Cyp19a1b*, *Dmrt1*, *Gdf6a/6b*, and *Sox9a/9b*) were identified. The genes were subjected to chromosomal localization, whole genome and gene annotation files of XX/XY-type *Oryzias latipes* and *Oreochromis niloticus*, ZZ/ZW-type *Cynoglossus semilaevis* and *Oreochromis aureus*, and polygenic sex-determined zebrafish were then downloaded from the NCBI database for inter-species covariance analysis. Subsequently, phylogenetic analyses were performed, and the amino acid sequences were compared using Protein BLAST on the NCBI database. The amino acid sequences of other Osteichthyes and higher vertebrates were downloaded separately, and the phylogenetic tree was constructed using the neighbour-joining (NJ) method; followed by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) to detect the distribution of the expression of these genes in the tissues of adult cobia and their expression levels in gonadal tissues of different developmental stages, with the aim of screening for sex-specific genes, which will provide research materials for further exploring the mechanism of sex determination and differentiation of cobia, as well as providing a reference for the screening of sex markers in cobia.

Chromosomal localization revealed that the five genes were located on seven different chromosomes of cobia without clustering. The results of covariance analyses showed that three of the five genes in cobia were covariant with XX/XY, ZZ/ZW and polygenic sex-determining fish, of which only the covariant gene for *Amh* was localized on the Y chromosome of XX/XY fish, all other genes are localized to autosomes. The results of interchromosomal covariance analyses showed homology between Chr7, where *Amh* is located, and the Y chromosome of XX/XY type fish. Phylogenetic analyses showed that each of the five genes clustered together (*Sox9a* and *Sox9b* clustered together, *Gdf6a* and *Gdf6b* clustered together), and that the scleractinians formed a separate branch in each of the gene clusters, independent of other higher vertebrates; *Amh*, *Dmrt1*, *Cyp19a1b* and *Gdf6a* were the closest relatives to *Echeneis naucrates*, *Gdf6b* was the closest relative to *Lateolabrax japonicus*, and *Sox9a* and *Sox9b* were the closest relatives to *Seriola dumerili*.

The qRT-PCR results showed that *Amh* and *Dmrt1* were specifically expressed only in the testis of cobia, which represent the male-specific genes of cobia. *Gdf6a* and *Gdf6b* were both highly expressed in the testis and skin, which may be male-biased genes. Finally, *Cyp19a1b*, *Sox9a* and *Sox9b* were expressed to varying degrees in tissues such as brain, skin, and heart. In the gonads of cobia at stages III to V, the expression of all five genes in the testis was extremely significantly higher than that in the ovary at the same period ($P < 0.01$), and all were significant increased followed by a decrease in gonadal maturation, except for a significant decrease in *Sox9b*. The above results suggest that these genes may play important roles in spermathecae development in cobia, and the results may lay a foundation for revealing the regulatory mechanism of gonadal development in cobia.

Key words *Rachycentron canadum*; Genders; Gonadal growth; Gene expression; Phylogenetic