

## 大黄鱼性别特异SNP标记的开发与验证

林晓煜, 肖世俊, 李完波, 王志勇\*

(集美大学水产学院, 农业部东海海水健康养殖重点实验室, 福建 厦门 361021)

**摘要:** 大黄鱼是我国养殖量最大的海水经济鱼类, 其雌鱼生长显著快于雄鱼, 但两性的外部形态差异不明显, 也没有异形性染色体, 依靠传统方法无法对其活体准确进行生理性别和遗传性别的判别与鉴定, 需要开发性别特异的分子标记。本研究从2尾雌鱼和2尾雄鱼、以及分别由50雌鱼与50尾雄鱼组成的2个混合样品的基因组重测序数据比较中筛选与性别显著关联的SNP位点, 对其中11个位点分别设计引物在15尾雌鱼和15尾雄鱼中扩增出PCR产物进行Sanger测序验证, 鉴定出1个与性别完全连锁的位点(SNP6, 15尾雌鱼均为纯合、15尾雄鱼均为杂合)。然后, 设计等位基因特异性PCR引物, 其中包括2条雌性与雄性通用引物和1条雄性特异引物, 在闽—粤东族与岱衢族大黄鱼合计近2 200个个体中进行扩增, 结果在全部雌鱼中都只扩增出1个348 bp的条带, 而在全部雄鱼中还扩增出1个194 bp的Y染色体特异条带, 检出率达到100%。研究表明, 大黄鱼属于XX♀-XY♂类型的性别决定。本研究鉴定出一个雄性特异SNP标记, 并建立了一种新的大黄鱼遗传性别鉴定技术, 为大黄鱼单性育种、基因组选择育种和性别决定分子机制研究提供了重要的技术手段。

**关键词:** 大黄鱼; 性别特异SNP; 遗传性别鉴定; AS-PCR

**中图分类号:** Q 785; S 917.4

**文献标志码:** A

大黄鱼(*Larimichthys crocea*)在分类上隶属于鲈形目(Perciformes)、石首鱼科(Sciaenidae)、黄鱼属(*Larimichthys*), 是我国当前养殖量最大的海水鱼类, 其生长存在明显的雌雄二态性, 雌鱼生长明显快于雄鱼, 养殖全雌群体可以显著提高养殖产量<sup>[1-2]</sup>。大黄鱼雄鱼体型一般较为修长美观, 体色一般也较为鲜黄, 在市场上可以获得较高的售价, 因而近年来也有部分养殖者希望养殖全雄大黄鱼。因此, 开展性别控制育种, 培育全雌或全雄大黄鱼都具有很大的实践意义。近几年来, 随着分子生物学的发展, 全基因组选择等新兴分子育种技术在水产生物包括大黄鱼上得到了应用<sup>[3-4]</sup>。性别控制育种和基因组选择育种中都需要准确判别亲本的遗传性别, 但大黄鱼雌鱼与雄鱼外形差异不明显, 也

不存在异形性染色体, 无法根据外部形态或组织学观察判别大黄鱼的遗传性别, 甚至无法准确地判别其表型(生理)性别, 亟需开发性别特异的分子标记<sup>[5-9]</sup>。

性别特异分子标记可用于对生物的遗传性别进行准确地识别, 在性别控制育种和性别决定分子机制等研究中有十分重要的作用。因此, 鱼类性别特异分子标记的研究受到了鱼类遗传育种研究者的广泛重视, 已有许多鱼类找到了性别相关的DNA分子标记, 建立了以PCR为基础的遗传性别鉴别技术。例如Wang等<sup>[10]</sup>和Dan<sup>[11]</sup>等利用扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)与基因组步移测序等技术在黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)中分离出分别与X和Y染色体连锁的多个DNA分子标

收稿日期: 2018-02-11 修回日期: 2018-03-01

资助项目: 国家自然科学基金重点支持项目(U1705231); 国家海水鱼类产业技术体系(CARS-47-G04)

通信作者: 王志勇, Email: zywang@jmu.edu.cn

记,并应用于XY与YY鱼的识别,极大地促进了黄颡鱼全雄育种的进展<sup>[12]</sup>;该团队在银鲫(*Carrasius auratus gibelio*)<sup>[13]</sup>和乌苏里拟鲮(*Pseudobagrus ussuriensis*)<sup>[14]</sup>等鱼类上也开发出了性别特异分子标记,促进了这些鱼类性别决定机制的研究。陈松林等<sup>[15-18]</sup>先后在半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)开发出多个性别特异的AFLP标记与SSR标记并转化成SCAR标记,建立半滑舌鲷遗传性别鉴定的PCR检测技术,为半滑舌鲷性别决定机制的研究和性别控制奠定了重要基础。鉴于性别特异分子标记的重要作用,国内多个实验室曾先后采用RAPD、AFLP等技术开展了大黄鱼性别特异分子标记分离的研究。本实验室Ning等<sup>[19]</sup>在构建大黄鱼AFLP标记遗传连锁图谱时曾发现1个与雄性性别共分离的标记,但在通过染色体步移获得了侧翼序列,将其转化为SCAR标记后,却未能在该家系之外的雄性个体中得到特异性扩增;之后本实验室又利用多种限制性内切酶组合,设计了256个组合的AFLP选择性扩增引物进行大黄鱼性别特异分子标记挖掘,观察了2万多个AFLP扩增条带,仍未能找到只在雄性或雌性大黄鱼中特异性扩增的分子标记。苗亮<sup>[20]</sup>曾进行大黄鱼性别特异AFLP标记的筛选,但也未能获得成功。为此,本实验室利用从转录组测序数据中挖掘的基因编码区SNP(coding-region SNP, cSNP)标记绘制了大黄鱼高密度遗传图谱<sup>[21]</sup>,利用该图谱通过连锁分析和全基因组关联分析定位了大黄鱼的性别决定区域,然后,通过仔细比较该区域所在连锁群(染色体)雌性和雄性大黄鱼DNA序列差异,在雄性大黄鱼的基因组性别决定区域中发现了一个15 bp的缺失和一些表现与性别显著相关(雌性为纯合、雄性为杂合)的SNP标记,并利用该15 bp的缺失作为分子标记,成功建立了准确有效鉴定大黄鱼遗传性别的方法<sup>[22]</sup>。然而,我们在利用该分子标记对更多的个体进行遗传性别鉴定时,发现存在部分个体难以获得正常扩增的情况。显然,有必要开发多个不同的性别特异分子标记以满足科学研究与育种实践的需要。为此,本实验针对在雌雄大黄鱼基因组序列比对中发现的部分与性别显著相关的SNP标记设计特异性引物进行扩增验证,开发新的大黄鱼雄性性别(Y染色体)特异分子标记,并建立了PCR的检测技术。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验标本的来源

实验所用的大黄鱼主要来源于福建省宁德市金铃水产科技有限公司,为人工养殖的“闽—粤东族”大黄鱼,部分个体来源于浙江省宁波市海洋与渔业研究院从岱衢洋捕获的野生大黄鱼繁育的后代,即“岱衢族”大黄鱼。用于标记开发验证的全部个体均解剖观察记录其生理性别,然后剪取其胸鳍用95%的酒精固定后,保存于-20℃冷库中。

### 1.2 DNA的提取

采用GENERAY公司的细胞/组织基因组DNA提取试剂盒提取大黄鱼DNA,用1.2%琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性,用紫外分光光度计测量其OD值,调整DNA浓度至50 ng/μL,于-20℃冻存待用。

### 1.3 性别相关SNP的挖掘

用于挖掘性别相关SNP的大黄鱼共104尾,其中2尾雌鱼和2尾雄鱼(分别称为雌1、雌2和雄1、雄2,为用于构建遗传连锁图谱的家系亲本)分别进行单个体全基因组重测序文库构建和测序;另外100尾(50雌50雄,分别称为雌鱼混样与雄鱼混样)每个个体取等量的DNA,按雌雄分别混合构成2个混合样品进行重测序文库构建和测序。上述建库和测序工作均由北京迈基诺基因科技股份有限公司进行,文库插入片段大小为300 bp,测序平台为Illumina HiSeq 2500,测序模式100PE。测序获得的原始数据按标准的生物信息学流程进行去接头、质量评估和过滤等处理后,获得的clean reads比对到本实验室组装的大黄鱼参考基因组(ENA登录号:PRJEB24300),进行SNP的挖掘。

### 1.4 性别相关SNP位点的PCR引物设计、扩增与验证

从挖掘到的SNP中挑选11个与性别显著相关(等位基因频率分布在雌鱼与雄鱼间存在极其显著差异,表1)的位点作为候选SNP位点,根据其侧翼序列用Primer 6软件设计普通PCR扩增引物,分别用约30尾经解剖确认性别的大黄鱼(雌雄各半)的基因组DNA为模板进行PCR扩增,扩

增产产物进行Sanger测序验证(深圳华大基因研究院), 排除假阳性位点, 针对初步验证确定的阳性位点(SNP6), 设计等位基因特异性扩增(AS-

PCR)引物(图1), 用更多的大黄鱼个体进行扩增验证。全部引物合成均由北京六合华大基因科技有限公司完成。

表 1 大黄鱼6个重测序样本9号连锁群11个SNP位点的基因型

Tab. 1 Genotypes of 11 SNP loci in LG9 in 6 resequencing samples of *Larimichthys crocea*

标记位置 SNP locus	标记位点的等位基因 alleles	雌鱼混样 females mixed	雌1 female 1	雌2 female 2	雄鱼混样 males mixed	雄1 male 1	雄2 male 2
LG9_420449(SNP1)	A/G	23/1	23/0	28/2	47/14	20/24	24/16
LG9_420489(SNP2)	G/A	12/0	15/0	14/1	35/10	13/18	15/15
LG9_420490(SNP3)	G/T	23/1	23/0	14/0	35/10	13/18	15/15
LG9_8977035(SNP4)	C/T	2/20	0/23	0/22	43/16	32/12	30/10
LG9_9696264(SNP5)	C/T	31/0	25/0	25/0	33/35	21/26	24/25
LG9_9698145(SNP6)	C/T	30/0	18/0	23/0	28/40	22/17	36/22
LG9_22969822(SNP7)	C/A	23/3	19/1	27/0	42/33	26/24	10/24
LG9_23002060(SNP8)	G/T	26/2	30/1	27/0	51/24	17/32	23/13
LG9_23783529(SNP9)	C/G	29/3	16/0	22/3	34/18	23/18	25/21
LG9_23921422(SNP10)	C/A	37/3	21/0	17/0	38/18	25/22	21/33
LG9_23921440(SNP11)	A/G	36/1	19/0	18/0	30/23	28/22	21/33

注: 大黄鱼6个重测序样本雌鱼混样(50尾雌鱼)、雄鱼混样(50尾雄鱼)为分别混合建库测序, 雌1、雌2和雄1、雄2则为单个体测序

Notes: 6 resequencing samples of large yellow croaker are females mixed (a mixed sample of 50 females), Males mixed (a mixed sample of 50 males), Female 1 and 2 are a single female fish, Male 1 and 2 are a single male fish, respectively

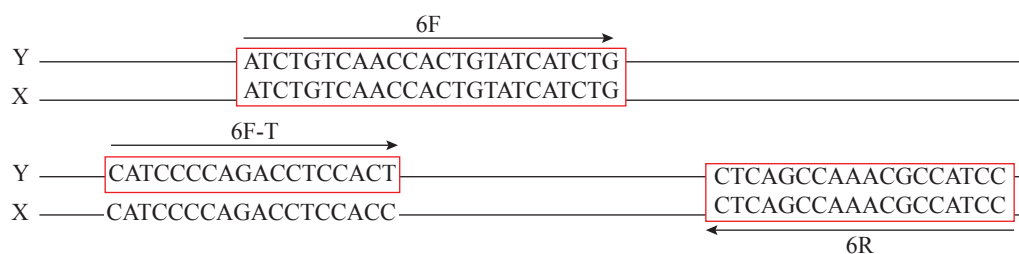


图 1 SNP6标记引物设计示意图

Fig. 1 Schematic diagram of primer design for SNP6

候选SNP位点的PCR扩增反应总体积25.0  $\mu$ L, 其中包含大黄鱼基因组DNA 1.0  $\mu$ L, 正向引物和反向引物各0.5  $\mu$ L, *Taq* DNA聚合酶0.25  $\mu$ L, 10 $\times$ PCR buffer 2.5  $\mu$ L, dNTPs 2.0  $\mu$ L, 加超纯水至25.0  $\mu$ L。PCR扩增程序为94  $^{\circ}$ C预变性5 min; 94  $^{\circ}$ C变性30 s, 参考 $T_m$ 值下退火30 s, 72  $^{\circ}$ C延伸30 s, 35个循环; 最后再72  $^{\circ}$ C终延伸10 min。

以经解剖确认性别的大黄鱼基因组DNA为模板进行AS-PCR特异性扩增, PCR反应体系10.0  $\mu$ L, 其中模板DNA 1.0  $\mu$ L, 针对SNP6设计的普通引物(6F-1、6R-1)和特异引物(6F-T)各0.2  $\mu$ L, *Taq* DNA聚合酶0.1  $\mu$ L, 10 $\times$ PCR buffer 1.0  $\mu$ L,

dNTPs 0.8  $\mu$ L, 加超纯水至10.0  $\mu$ L。扩增程序为94  $^{\circ}$ C预变性5 min; 94  $^{\circ}$ C变性30 s, 62  $^{\circ}$ C退火30 s, 72  $^{\circ}$ C延伸30 s, 35个循环; 72  $^{\circ}$ C终延伸10 min。扩增产物经1.2%琼脂糖凝胶电泳鉴定。

## 2 结果

### 2.1 性别相关SNP位点的筛选

3组雌雄大黄鱼基因组重测序数据经比对到本实验室组装的大黄鱼参考基因组进行SNP挖掘, 在9号连锁群发现有一些SNP或小的插入/缺失(in/del)位点, 在雌鱼均为纯合或接近纯合(等

位基因分离比偏离1:1的概率小于0.001), 雄鱼则为杂合且2个等位基因支持的reads数的比例等

于或接近1:1, 其中11个位点的基因型及支持2个等位基因的reads数量分布情况见表2。

表2 11个候选位点的Sanger测序验证结果

Tab. 2 Sanger sequencing verification results of 11 candidate loci

位点 locus	预期基因型 expected genotypes	雌鱼 female		雄鱼 male	
		杂合 heterozygotes	纯合 homozygotes	杂合 heterozygotes	纯合 homozygotes
SNP1	A/A或A/G	0	4	0	8
SNP2	G/G或G/A	0	4	1	7
SNP3	G/G或G/T	3	1	4	4
SNP4	G/G或G/T	2	15	8	GG:TT=5:5
SNP5	C/C或C/T	0	17	17	0
SNP6	C/C或C/T	0	15	15	0
SNP7	C/C或C/A	1	CC:AA:TT=4:9:1	1	CC:AA=12:2
SNP8	C/C或C/G	4	14	6	13
SNP9	C/C或C/T	6	7	6	2
SNP10	C/C或C/A	1	14	10	5
SNP11	A/A或A/G	1	14	10	5

## 2.2 性别相关SNP位点的验证

以上述11个位点作为候选位点, 分别设计引物进行PCR扩增和Sanger测序验证, 其中9个位点在雌鱼中也出现不同程度的杂合或/及在雄鱼中出现纯合, SNP4位点在雄鱼中还出现了GG与TT 2种纯合子, SNP7位点在雌鱼中存在4种不同的基因型、在雄鱼中存在3种不同的基因型。只有SNP5与SNP6位点的测序结果与二代测序结果相一致, 即用于验证的雌鱼在该位点全部为纯合子、雄鱼全部为杂合子(表3, 图2)。

## 2.3 SNP7特异性检测引物的开发与验证

基于上述Sanger测序验证的结果, 设计了6F-T作为特异性引物, 与6F和6R相配合, 以用于Sanger测序的30尾大黄鱼的基因组DNA为模板进行扩增, 结果在15尾雌鱼均只扩增出1个348 bp条带, 在15尾雄鱼中除了348 bp条带外, 同时扩增出1个194 bp的条带。为了进一步验证SNP6位点作为大黄鱼性别特异分子标记的可靠性, 以另外48尾经解剖确认性别(24雌24雄)的大黄鱼DNA为模板进行PCR扩增, 结果显示, 该位点在大黄鱼雌鱼与雄鱼之间的差异明显, 是稳定的雌雄差异位点(图3)。之后, 我们在进行大黄

鱼基因组选择育种等实验中, 将该标记与此前本实验室Lin等<sup>[22]</sup>报道的雄性大黄鱼特异分子标记一起用于合计2 137尾候选亲本或实验标本(其中包括11尾来自宁波市海洋与渔业研究院的“甬岱1号”岱衢族大黄鱼幼鱼)的遗传性别鉴定, 全部个体用SNP6引物都获得良好的扩增, 能检测到清晰的预期电泳条带; 除了有13个个体用Lin等<sup>[22]</sup>报道的标记引物没有扩增成功、难以进行性别判别外, 其余个体两者检测获得的结果完全一致。SNP5因附近存在其他变异位点, 难以设计等位基因特异性检测引物, 故其是否为稳定的雌雄差异位点可用作遗传性别鉴定的分子标记, 本研究中未作进一步验证。

## 3 讨论

大黄鱼是我国重要的海水养殖鱼类, 其雌性与雄性存在生长和经济价值的二态性, 性别控制育种实践及性别决定与发育的分子遗传基础研究均需要灵敏可靠的遗传性别鉴定技术。本实验通过对3组雌雄大黄鱼基因组重测序数据进行仔细比对, 在*dmrt1*基因所在的9号连锁群找到了一批在两性之间差异显著的SNP位点, 经验证证实其中LG9\_9698145位点为可真实遗传的、

表 3 本实验中使用的PCR引物序列及退火温度

Tab. 3 Primer sequences and annealing temperatures for PCR used in this study

SNP位置及编号 SNP location and No.	引物名 primer name	引物序列 primer sequences	退火温度/°C annealing temperature
LG9_420449 (SNP1)	1/2/3F 1/2/3R	5'-GCCTCCAGCACCTTCTTCA-3'	58
LG9_420489 (SNP2)		5'-GCAGTGAGAGTGTCTGTCGT-3'	
LG9_420490 (SNP3)			
LG9_8977035 (SNP4)	4F	5'-GCGGGTTGAGGCTGTGTTT-3'	57
	4R	5'-TGGCAGATGTTAGTGGCAGTC-3'	
LG9_9696264 (SNP5)	5F	5'-GCATTTCTCTCGTTCGTTATTCAG-3'	60
	5R	5'-CCGCTCTTACCGTTCACAATC-3'	
LG9_9698145 (SNP6)	6F	5'-ATCTGTCAACCACTGTATCATCTG-3'	62
	6R	5'-GGATGGCGTTTGGCTGAG-3'	
	6F-T	5'-CATCCCCAGACCTCCACT-3'	
LG9_22969822(SNP7)	7F	5'-TACCCGTAAGGCACTTTGGTT-3'	56
	7R	5'-CCTGGTCAGATCCAATATCCATC-3'	
LG9_23002060 (SNP8)	8F	5'-ACATGATGCTGGCTAACATTGC-3'	56
	8R	5'-ACTTTGACGCTGACGAAACTC-3'	
LG9_23783529(SNP9)	9F	5'-CTCTCGTTCTATCTTTGTCTCTGC-3'	57
	9R	5'-TACTGAATCTTACTTGTCTGCTGGC-3'	
LG9_2392149(SNP10)	10/11F	5'-CAGAAGCACCAAGAGGATGTC-3'	54
LG9_23921440(SNP1)	10/11R	5'-TGCACAGTACTTAGGTAATGTA-3'	

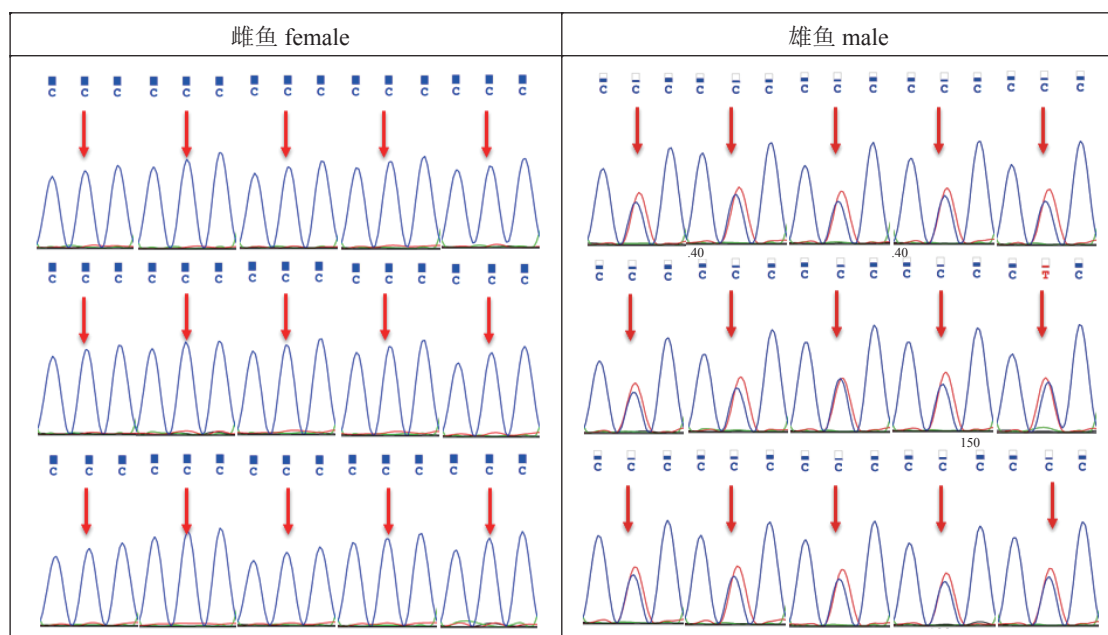


图 2 30尾大黄鱼SNP6位点测序峰图(图中红色箭头处为SNP6位点)

Fig. 2 Sequence map of SNP6 of 30 *Larimichthys crocea* (SNP6 indicated by red arrow)

雌雄之间稳定的差异位点, 为大黄鱼性别控制育种和相关的遗传学基础研究提供了有用的技术手段。

雌雄个体之间存在稳定差异的SNP标记在其他鱼类也曾见过报道。例如Kamiya等<sup>[23]</sup>与Matsunaga等<sup>[24]</sup>分别在红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)

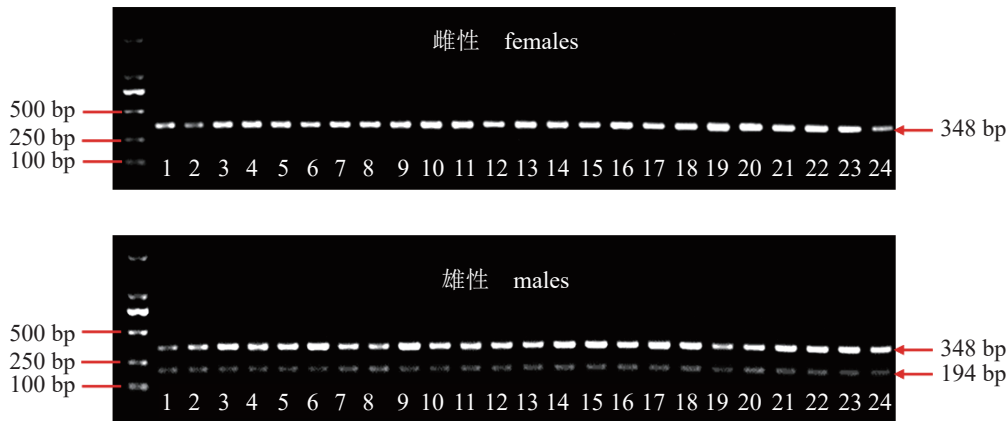


图3 用SNP6位点特异引物对48尾大黄鱼基因组DNA扩增和电泳检测的结果

Fig. 3 Banding patterns of 24 females and 24 males large yellow croaker amplified from genomic DNA by using specific primers of SNP6 locus

与弓斑东方鲀(*T. ocellatus*) Y染色体的*Amhy*II基因上发现了导致错义突变、与性别决定相关的SNP; Li等<sup>[25]</sup>在尼罗罗非鱼Y染色体*Amhy*基因上也发现了一个对其雄性性别发育必不可缺的错义SNP。本研究中发现的雄性特异SNP标记, 经比对到大黄鱼参考基因组并查找相关序列的注释信息, 发现其位于*dmrt1*基因上游约5 kb的环指蛋白(RING finger protein)基因的第2外显子上, 与本实验室Lin等<sup>[22]</sup>报道的大黄鱼性别特异分子标记一样处于QTL定位的性别决定区域内。本研究结果进一步证明了大黄鱼是属于雄性异配、雌性同配, 即XX♀-XY♂型的性别决定机制, 9号连锁群就是大黄鱼的性染色体。推测该标记位点的存在与大黄鱼性染色体分化之后, 其性别决定区域内同源染色体之间的交换受到抑制有关<sup>[26]</sup>。鉴于该SNP始终表现与性别相连锁, 而且其引起的变异属于错义突变(密码子由cCc变成cTc, 使该环指蛋白第160位氨基酸由苯丙氨酸变为亮氨酸), 其是否也与大黄鱼性别决定相关, 值得加以深入研究。

SNP标记的检测目前已发展出许多种方法, 如变性梯度凝胶电泳(denatured gradient gel electrophoresis, DGGE)、聚合酶链式反应—限制性片段长度多态性法(cleaved amplification polymorphism sequence-tagged sites, CAPs)以及*Taq* Man探针技术等, 还可以通过一代、二代测序来检测, 但这些方法操作繁琐, 耗时较长, 检测费用也较高<sup>[27-30]</sup>。等位基因特异性PCR在完成引物开发后, 只需通过一次PCR反应和简单的凝胶电泳就能准确确定

所检测SNP位点的基因型<sup>[31]</sup>, 应用简单方便, 费用也低。本实验根据SNP位点两边侧翼序列情况, 综合考虑了实验时间和PCR扩增效果等方面的因素后, 经过优化, 将四引物法简化成只使用三条引物, 所有待测个体都可以由共用引物扩增得到348 bp的片段, 起到阳性对照的作用, 而具有Y染色体的个体(遗传雄性)则还会出现一个194 bp的特异片段, 从而只通过一次PCR反应就能准确鉴定出大黄鱼的遗传性别, 既保持了四引物法的优势, 同时又方便了引物设计(减少了一条引物, 也减少了引物之间产生引物二聚体的机会), 并节省了检测的成本。包括一代测序验证的个体在内, 本实验开发的引物已经用于合计2 191尾大黄鱼的遗传性别鉴定, 其中包括闽—粤东族与岱衢族大黄鱼。实践证明, 本实验开发的引物在所有个体都获得清晰的扩增条带, 鉴定出的性别与解剖看到的性腺性别或与用Lin等<sup>[22]</sup>报道的标记鉴定的结果完全一致, 雌雄检出率达到100%; 说明至少在当前养殖的闽—粤东族与岱衢族大黄鱼中, 该SNP标记与性别相连锁。目前养殖的大黄鱼包括来源于福建省宁德市官井洋海区的闽—粤东族和来源于浙江省舟山海区的岱衢族大黄鱼, 因此, 本实验开发的标记可以应用到当前所有养殖大黄鱼的遗传性别鉴定。

本实验室叶坤、胡国良协助采集闽—粤东族大黄鱼标本, 王甯协助进行图表处理, 本实验室研究生王伟佳、韩兆方协助进行部分生物信息学的分

析工作; 宁波市海洋与渔业研究院沈伟良提供岱衢族大黄鱼标本, 在此一并致谢。

### 参考文献:

- [1] 农业部渔业渔政管理局. 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2016.  
Fisheries and Fisheries Administration Bureau of the Ministry of Agriculture. China fishery statistical year-book[M]. Peking: China Agriculture Press, 2016(in Chinese).
- [2] 陈松林. 鱼类性别控制与细胞工程育种[M]. 北京: 科学出版社, 2013.  
Chen S L. Fish sex control and cell engineering breeding[M]. Beijing: Science Press, 2013(in Chinese).
- [3] Dong L S, Xiao S J, Chen J W, *et al.* Genomic selection using extreme phenotypes and pre-selection of SNPs in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[J]. Marine Biotechnology, 2016, 18(5): 575-583.
- [4] Dong L S, Xiao S J, Wang Q R, *et al.* Comparative analysis of the GBLUP, emBayesB, and GWAS algorithms to predict genetic values in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[J]. BMC Genomics, 2016, 17: 460.
- [5] 谌微, 王盼盼, 肖世俊, 等. 大黄鱼形态指标体系及雌雄差异分析[J]. 集美大学学报(自然科学版), 2014, 19(6): 401-408.  
Chen W, Wang P P, Xiao S J, *et al.* Analysis of morphological index system and sexual differences of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[J]. Journal of Jimei University (Natural Science), 2014, 19(6): 401-408(in Chinese).
- [6] 陈紫莹, 王志勇, 刘贤德, 等. 大黄鱼中期染色体面积和物理长度的测定[J]. 水产学报, 2014, 38(5): 632-637.  
Chen Z Y, Wang Z Y, Liu X D, *et al.* Area and physical length of metaphase chromosomes in large yellow croaker(*Larimichthys crocea*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(5): 632-637(in Chinese).
- [7] 全成干, 王军, 丁少雄, 等. 大黄鱼染色体核型研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2000, 39(1): 107-110.  
Quan C G, Wang J, Ding S X, *et al.* The karyotypes of *Pseudosciaena crocea* (Richardson)[J]. Journal of Xiamen University (Natural Science), 2000, 39(1): 107-110(in Chinese).
- [8] 吴建绍, 林琪, 曾志南. 大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)的染色体研究[J]. 福建水产, 2001(4): 60-63.  
Wu J S, Lin Q, Zeng Z N. The chromosome study of *Pseudosciaena crocea*[J]. Journal of Fujian Fisheries, 2001(4): 60-63(in Chinese).
- [9] 邹曙明, 李思发, 赵金良, 等. 福建官井洋海区大黄鱼的染色体核型分析[J]. 上海水产大学学报, 2003, 12(2): 179-181.  
Zou S M, Li S F, Zhao J L, *et al.* Karyotype of *Pseudosciaena crocea* in Guanjingyang of Fujian[J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2003, 12(2): 179-181(in Chinese).
- [10] 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.
- [11] Dan C, Mei J, Wang D, *et al.* Genetic differentiation and efficient sex-specific marker development of a pair of Y-and X-linked markers in yellow catfish[J]. International Journal of Biological Sciences, 2013, 9(10): 1043-1049.
- [12] Liu H Q, Guan B, Xu J, *et al.* Genetic manipulation of sex ratio for the large-scale breeding of YY Super-male and XY all-male yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco* (Richardson))[J]. Marine Biotechnology, 2013, 15(3): 321-328.
- [13] Wang D, Mao H L, Peng J X, *et al.* Discovery of a male-biased mutant family and identification of a male-specific SCAR marker in gynogenetic gibel carp *Carassius auratus gibelio*[J]. Progress in Natural Science, 2009, 19(11): 1537-1544.
- [14] Pan Z J, Li X Y, Zhou F J, *et al.* Identification of sex-specific markers reveals male heterogametic sex determination in *Pseudobagrus ussuriensis*[J]. Marine Biotechnology, 2015, 17(4): 441-451.
- [15] 李静, 陈松林, 邓思平, 等. 半滑舌鳎雌性特异扩增片段长度多态性标记的筛选与应用[J]. 水产学报, 2007, 31(5): 591-597.  
Li J, Chen S L, Deng S P, *et al.* Isolation and application of female-specific amplified fragment length polymorphism markers in *Cynoglossus semilaevis*[J]. Journal of Fisheries of China, 2007, 31(5): 591-597(in Chinese).
- [16] Chen S L, Ji X S, Shao C W, *et al.* Induction of mitogynogenetic diploids and identification of WW super-female using sex-specific SSR markers in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. Marine Biotechnology, 2012, 14(1): 120-128.



- [17] 刘洋, 陈松林, 高峰涛, 等. 半滑舌鲷性别特异微卫星标记的SCAR转化及其应用[J]. 农业生物技术学报, 2014, 22(6): 787-792.
- Liu Y, Chen S L, Gao F T, *et al.* SCAR-transformation of sex-specific SSR Marker and its application in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2014, 22(6): 787-792(in Chinese).
- [18] Liao X L, Xu G B, Chen S L. Molecular method for sex identification of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) using a novel sex-linked microsatellite marker[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2014, 15(7): 12952-12958.
- [19] Ning Y, Liu X D, Wang Z Y, *et al.* A genetic map of large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*[J]. Aquaculture, 2007, 264(1-4): 16-26.
- [20] 苗亮. 大黄鱼异源精子诱导雌核发育及性别特异性 AFLP标记筛选[D]. 宁波: 宁波大学, 2012.
- Miao L. Induction of gynogenesis by heterologous sperm and isolation of SEX-specific AFLP markers in *Pseudosciaena crocea*[D]. Ningbo: Ningbo University, 2012(in Chinese).
- [21] Xiao S J, Wang P P, Zhang Y, *et al.* Gene map of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) provides insights into teleost genome evolution and conserved regions associated with growth[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 18661.
- [22] Lin A Q, Xiao S J, Xu S B, *et al.* Identification of a male-specific DNA marker in the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[J]. Aquaculture, 2017, 480: 116-122.
- [23] Kamiya T, Kai W, Tasumi S, *et al.* A trans-species missense SNP in *Amhr2* is associated with sex determination in the tiger pufferfish, *Takifugu rubripes* (Fugu)[J]. PLoS Genetics, 2012, 8(7): e1002798.
- [24] Matsunaga T, Ieda R, Hosoya S, *et al.* An efficient molecular technique for sexing tiger pufferfish (fugu) and the occurrence of sex reversal in a hatchery population[J]. Fisheries Science, 2014, 80(5): 933-942.
- [25] Li M H, Sun Y L, Zhao J, *et al.* A tandem duplicate of Anti-Müllerian hormone with a missense SNP on the Y chromosome is essential for male sex determination in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*[J]. PLoS Genetics, 2015, 11(11): e1005678.
- [26] Tennessen J A, Govindarajulu R, Liston A, *et al.* Homomorphic ZW chromosomes in a wild strawberry show distinctive recombination heterogeneity but a small sex-determining region[J]. New Phytologist, 2016, 211(4): 1412-1423.
- [27] Syvänen A C. Accessing genetic variation: Genotyping single nucleotide polymorphisms[J]. Nature Reviews Genetics, 2001, 2(12): 930-942.
- [28] 张哲, 许德义, 蒋晓飞. 变性梯度凝胶电泳检测鲍曼不动杆菌中SHV基因单核苷酸多态性[J]. 现代实用医学, 2009, 21(8): 799-801, 807.
- Zhang Z, Xu D Y, Jiang X F. Detection of single nucleotide polymorphism of SHV gene in *Acinetobacter baumannii* using denaturing gradient gel-electrophoresis[J]. Modern Practical Medicine, 2009, 21(8): 799-801, 807(in Chinese).
- [29] Glenn K L, Grapes L, Suwanosopee T, *et al.* SNP analysis of *AMY2* and *CTSL* genes in *Litopenaeus vannamei* and *Penaeus monodon* shrimp[J]. Animal Genetics, 2005, 36(3): 235-236.
- [30] Kim S, Misra A. SNP Genotyping: Technologies and biomedical applications[J]. Annual Review of Biomedical Engineering, 2007, 9: 289-320.
- [31] 张建勇. 中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)基因组 SNP标记的开发与应用[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011.
- Zhang J Y. Development and application of SNP markers in genome of shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*)[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2011(in Chinese).



## Development and validation of sex - specific SNP markers in *Larimichthys crocea*

LIN Xiaoyu , XIAO Shijun , LI Wanbo , WANG Zhiyong \*

(Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea, Ministry of Agriculture,  
Fisheries College of Jimei University, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** *Larimichthys crocea* is the largest cultured marine fish species in annual production in China. It shows obvious sex-related dimorphism in growth, where females grow much faster than males. It is difficult to distinguish the gender of the *L. crocea* through morphological characters, and also it has no evolutionarily differential sex chromosome. Currently, examination of the gonads after dissection is the most reliable way to distinguish the phenotypic sex in this fish. Given that the traditional methods is unsuitable for the identification of phenotypic and genetic sex, it is then necessary to develop sex-specific molecular markers, which is indispensable in sex-control breeding and understanding the mechanism of sex determination in this species. In order to develop sex-specific markers, sequencing data of short-insert libraries of 2 females and 2 males (30× coverage) and a pool of 50 females and a pool of 50 males (50× coverage) were utilized in this study. In brief, the raw sequencing reads were cleaned by removing Illumina sequencing adapters, low-quality sequences. The cleaned reads were aligned to our custom genome assembly (ENA accession no.: PRJEB24300) of the large yellow croaker using BWA, and the genome-wide SNPs were further called. We detected that 11 SNPs (hereafter referred as SNP 1~11) demonstrated obvious difference in allele frequency between males and females through comparative genomic approach. We further genotyped the 11 SNPs in 15 females and 15 males by PCR and Sanger sequencing, and found SNP 5 and SNP 6 were homozygous in all females and heterozygous in all males, perfectly segregated between sexes. We then devised an allelic-specific PCR (AS-PCR) based on SNP 6 for amplifying one band (348 bp) in females and two bands (348 bp and 194 bp) in males, and genotyped near 2 200 *L. crocea* sampled from Fujian, Guangdong and Zhejiang province. The genotyping result showed that all females were with the 348 bp band and all males were with the extra 194 bp band besides the 348 bp band in the AS-PCR followed by electrophoresis assay, suggesting 100% accuracy of the method in sex identification.

In conclusion, this study has detected and validated a male-specific (Y chromosome) SNP marker, and developed a simple method to identify the genetic sex for the large yellow croaker through the AS-PCR followed by electrophoresis assay. The finding provides an indispensable technical basis for sex-control breeding practice, genomic selection and the research on the molecular mechanism of sex determination in the *L. crocea*.

**Key words:** *Larimichthys crocea*; sex-specific SNP marker; genetic sex identification; allelic-specific PCR

**Corresponding author:** WANG Zhiyong. E-mail: zywang@jmu.edu.cn

**Funding projects:** Joint Funds of the National Natural Science Foundation of China (U1705231); China Agriculture Research System (CARS-47-G04)