



· 综述 ·

鱼类性别特异分子标记筛选及分子性控育种研究现状与展望

刘洋^{1,2,3}, 陈松林^{1,2,3*}

- (1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 海水养殖生物育种与可持续产出全国重点实验室, 山东 青岛 266071;
2. 山东省海洋渔业生物技术与遗传育种重点实验室, 山东 青岛 266071;
3. 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室, 山东 青岛 266071)

摘要: 本文系统介绍了鱼类性别特异分子标记筛选的研究历程、分子标记辅助性控育种的研究进展及展望。首先, 作者回顾了我国鱼类性别特异分子标记的研究历程, 包括探索期(2001—2006年), 突破期(2007—2012年)和快速发展期(2013—2023), 其中在突破期重点描述了半滑舌鲷、黄颡鱼等性别特异分子标记的发现, 为我国鱼类性别决定机制研究和性控育种提供了重要技术手段。其次介绍了分子标记辅助性控育种的研究进展, 采用性别特异分子标记辅助培育出半滑舌鲷“鲷优1号”, 黄颡鱼“全雄1号”、“全雄2号”等新品种, 极大的推动了我国鱼类性别控制育种研究工作。最后, 文章对我国鱼类性别特异分子标记筛选和分子标记辅助性控育种的未来发展方向进行了展望, 提出今后应从持续开发养殖鱼类性别特异分子标记、强化鱼类性别特异分子标记筛选方法创新、优化鱼类性别特异标记的应用方法等方面加强鱼类分子标记辅助性控育种的研究。

关键词: 鱼类; 性别特异分子标记; 性控育种; 研究历程; 进展; 展望

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

1 引言

中国是水产养殖大国, 近二十年来, 中国水产养殖产量一直占世界水产养殖总产量的三分之二左右, 具有举足轻重的地位。鱼类是水产养殖的主体, 鱼类养殖业是保障国家粮食安全的重要产业。2022年我国水产养殖总产量5 565.46万t, 其中鱼类养殖产量2 903.04万t, 占水产养殖总产量的52.16%。培育养殖鱼类良种, 提高单位水体的鱼类养殖产量, 增加鱼类养殖收益, 是践行“打好种业翻身仗”、实践大食物观、增加我国优质蛋白供应渠道与总量、提高我国食品安全指数和改

善全民膳食结构的有效途径。

许多鱼类都存在典型的性别二态性现象, 雌雄个体在生长速率上存在明显差异。如罗非鱼(*Oreochromis* spp.)和黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)等淡水鱼类雄鱼比雌鱼生长速率快30%~200%, 而大麻哈鱼(*Oncorhynchus keta*)、鳊(*Siniperca chuatsi*)和半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)等鱼类的雌性个体比雄性个体生长快, 特别是半滑舌鲷, 其雌性个体生长速率比雄性个体快2~4倍。因此, 开展上述鱼类的性别控制研究, 培育全雄(或全雌)苗种, 进行单性养殖对于提高单位养殖产量具有重要意义。鱼类性别控制和单

收稿日期: 2023-09-17 修回日期: 2023-10-26

资助项目: 国家自然科学基金(32230107); 中国水产科学研究院创新团队(2020TD20); 山东省泰山学者攀登计划工程专项

第一作者: 刘洋(照片), 从事鱼类遗传育种研究, E-mail: liuyang@ysfri.ac.cn

通信作者: 陈松林, 从事鱼类生物技术与遗传育种研究, E-mail: chensl@ysfri.ac.cn



性养殖一直都是国际上的重要研究课题, 而性别特异分子标记作为开展性别决定机制研究与性别控制的基础工具, 始终是鱼类性别决定和性别控制研究中的前沿热点, 国际上一直都在寻找不同鱼类性别特异的分子标记, 并建立可靠的遗传性别鉴定方法。

自 20 世纪 90 年代以来, 科学家纷纷采用限制性内切酶片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP)、随机扩增多态性 DNA 标记 (random amplified polymorphic DNA, RAPD)、扩增片段长度多态性 (amplified fragment length polymorphism, AFLP) 和简单重复序列 (simple sequence repeats, SSR) 等不同的分子标记技术, 尝试发掘鱼类性别特异分子标记。国外早期研究取得的进展主要包括 Devlin 等^[1]在大鳞钩吻鲑 (*O. tshawytscha*) 上开发出了 Y 染色体特异的雄性特异标记, 这是最早的鱼类性别特异分子标记的报道; Allendorf 等^[2]通过差减杂交方法在虹鳟 (*O. mykiss*) 上获得了 1 个雄性特异的 DNA 片段; Iturra 等^[3]用 RAPD 技术和集团分离分析法 (bulk segregant analysis, BSA) 在虹鳟基因组中找到了 2 个雄性特异的分子标记; Lee 等^[4]用 BSA 方法在尼罗罗非鱼 (*O. niloticus*) 上找到 10 个与表型性别连锁的微卫星标记, 这些标记可以用于不同 Y 染色体等位基因功能的研究和具有 1 个或者几个 Y 染色体拷贝的亲鱼的鉴定; Griffiths 等^[5]在三刺鱼 (*Gasterosteus aculeatus*) 中找到了 2 个雄性特异的 AFLP 标记, 但当应用于另外两种刺鱼时, 却未能正确的鉴定其性别; Ezaz 等^[6]用 AFLP 技术扫描尼罗罗非鱼基因组, 找到 3 个 Y 染色体连锁的 AFLP 标记, 然而这些标记却不能鉴别无亲缘关系的个体性别, 表明这些标记并不是物种通用的雄性特异分子标记。

我国养殖鱼类多达 200 余种, 很多鱼类都存在性别二态性现象, 具有单性育种的必要性, 因此, 鱼类性别特异分子标记筛选对于我国鱼类性别控制和养殖产业发展尤其重要。国内学者自 20 世纪初就开展了鱼类性别特异分子标记筛选的研究, 目前, 我国已在半滑舌鲷等三十多种养殖鱼类上筛选到性别特异分子标记, 并建立了分子标记辅助性控技术, 使我国在鱼类性别特异分子标记筛选上跻身国际前列。下面本文系统回顾一下我国鱼类性别特异分子标记筛选的研究历程、取得的重要进展及今后的发展方向。

2 我国鱼类性别特异分子标记研究历程

2.1 我国鱼类性别特异分子标记研究的探索期 (2001—2006)

借鉴国外鱼类性别特异分子标记的研究经验, 国内学者在不同鱼类上开展了相应的研究, 尝试在养殖鱼类中找到性别特异分子标记。如常重杰等^[7]利用 40 种随机引物在 2 种泥鳅的 3 个地理群体雌雄各 30 尾个体中未发现性别特异片段; 宋平等^[8]应用 RAPD 在黄颡鱼中也没有找到性别特异的 DNA 片段; 李建中等^[9]共采用了 120 个随机引物, 以雌、雄性异源四倍体鲫 (*Carassius auratus*)、鲤 (*Cyprinus carpio*) DNA 池为模板, 同时进行 RAPD 扩增, 发现有 14 个重复性好、带型清晰明亮且雌雄群体有差异, 但在进一步验证中, 只有引物 S129 在雌雄个体间存在差异。

2.2 我国鱼类性别特异分子标记筛选的突破期 (2007—2012)

半滑舌鲷性别特异分子标记的发现 半滑舌鲷 (*Cynoglossus semilaevis*) 主要生活于我国的黄渤海海域, 其肉味鲜美, 营养丰富, 深受消费者欢迎, 市场价值高。但半滑舌鲷雌雄个体生长差异大, 研究表明, 2 龄雌性成鱼体重平均为同龄雄鱼的 3.28 倍^[10], 而在普通养殖群体中, 雄鱼比例高达 80% 左右, 这导致半滑舌鲷养殖产量降低、成本升高, 影响了半滑舌鲷苗种的推广和产业的发展。因此, 开展半滑舌鲷性别控制研究, 提高雌鱼比例, 对于半滑舌鲷养殖产业高质量发展具有重要意义。要进行性别控制, 首先要能进行遗传性别鉴定, 因此, 筛选半滑舌鲷性别特异分子标记成为进行性别控制育种研究的重要前提。

半滑舌鲷雌性特异 AFLP 标记的发现 中国水产科学研究院黄海水产研究所陈松林团队, 采用 64 个 AFLP 引物组合对半滑舌鲷雌雄鱼基因组进行了扫描, 筛选到 7 个雌性特异的 DNA 条带, 并首次开发出半滑舌鲷雌性特异的 AFLP 分子标记 M1。随后, 根据雌性特异 AFLP 标记 M1 的核苷酸序列设计一对引物, 成功将 M1 转化为 SCAR 标记。使用研发的 SCAR 标记分别扩增 57 个雌性和 55 个雄性半滑舌鲷个体的 DNA, 在所有雌性个体中均扩增出一个特异的 DNA 条带, 而所有雄性个体中则未扩增出该条带, 从而证明了黄海所开发的半滑舌鲷雌性特异标记与 PCR 技

术的有效性^[11], 这也是我国发现的第一个鱼类性别特异分子标记。

半滑舌鲷性别特异微卫星标记的研发

半滑舌鲷是ZW型性别决定类型^[12]。根据遗传学经典理论, 半滑舌鲷雌鱼产生Z型和W型两种卵子, 通过人工雌核发育可以生产ZZ型雄性和WW型超雌两种雌核发育鱼苗, 将WW超雌鱼苗培育成熟, 然后与ZZ雄鱼交配, 即可大量生产ZW型全雌鱼苗。而要筛选培育WW超雌个体, 其前提是必须能鉴定出WW超雌个体和普通ZW雌性个体, 因此半滑舌鲷WW超雌个体的鉴定成为研制半滑舌鲷全雌鱼苗的关键。而中国水产科学研究院黄海水产研究所2007筛选到的半滑舌鲷雌性特异AFLP标记是一种显性遗传标记, 尽管能区分ZZ雄鱼和ZW雌鱼, 但难以区分ZW雌和WW超雌。因此, 探索能够区分半滑舌鲷ZW雌鱼和WW超雌的分子标记, 对于筛选和大量培育超雌个体, 进而培育半滑舌鲷全雌苗种, 具有重要意义。为此, 中国水产科学研究院黄海水产研究所在完成半滑舌鲷全基因组测序和组装的基础上, 对雌、雄鱼基因组序列进行比对发现了性别连锁的微卫星标记并进行了验证。结果表明, 其中1个微卫星标记CseF-SSR1与半滑舌鲷性别紧密连锁, 是性别特异微卫星标记。采用CseF-SSR1引物分别扩增性成熟的半滑舌鲷雌、雄鱼各12尾, 雌鱼可以扩增出2个片段, 而雄鱼只能扩增出其中1个片段, 因此, 确定仅在半滑舌鲷雌性中扩增出的DNA片段为W染色体特异片段^[13]。

采用上述微卫星标记对半滑舌鲷卵裂雌核发育孵出前胚胎进行鉴定, 从39尾异精卵裂雌核发育孵出前胚胎中检测到4个只含有W染色体片段胚胎, 由此初步表明, 在半滑舌鲷异精卵裂雌核发育孵出前胚胎中含有约10%的超雌个体。半滑舌鲷性别特异微卫星标记为半滑舌鲷性别控制和全雌育种提供了重要技术手段, 在半滑舌鲷繁殖用亲鱼鉴定、雌核发育鱼苗鉴定、性别控制以及高雌苗种培育中具有重大应用价值和广阔的推广前景。

黄颡鱼雄性特异AFLP标记的发现

黄颡鱼是我国重要淡水养殖鱼类。但黄颡鱼存在雌雄生长速率差异大, 雌鱼生长速率明显慢于雄鱼, 据报道, 雄鱼要比雌鱼生长速率快2倍。因此, 开展黄颡鱼性别控制研究, 培育全雄黄颡鱼苗种, 对于黄颡鱼养殖产业发展具有重要意义和应用价值。

中国科学院水生生物研究所桂建芳团队2009年使用256个AFLP引物组合对三种遗传性别的6个样品(XX混合样品、XX个体、XY混合样品、XY个体、YY混合样品和YY个体)进行PCR扩增后分析, 发现共有24个引物组合能够扩增出Y或X染色体连锁的片段。其中, 引物组合E6M3和E5M12扩增出X染色体连锁片段Pf63-X和Pf512X; 由此发现了黄颡鱼性染色体连锁的DNA片段, 筛选到黄颡鱼X和Y染色体连锁的AFLP标记^[14], 解决了黄颡鱼遗传性别鉴定的技术难题。

2.3 我国鱼类性别特异分子标记筛选的快速发展期(2013—2023)

我国鱼类性别特异分子标记筛选工作的爆发性增长 由于性别特异分子标记在鱼类性别决定机制研究和性控育种中的重要作用, 长期以来, 我国鱼类科研工作者一直努力在不同鱼类上筛选性别特异标记。然而, RFLP、RAPD、AFLP和SSR等分子标记开发与鉴定通量低, 工作量大, 加之鱼类性别决定机制复杂, 大多数鱼类具有性染色体分化不明显, 性别特异区间小等特点, 筛选到性别特异标记的鱼类种类较少。

2014年, 中国水产科学研究院黄海水产研究所陈松林领衔完成了我国第一个养殖鱼类(半滑舌鲷)全基因组测序工作^[15], 建立了通过雌、雄鱼基因组序列比对筛选性别特异分子标记的方法, 大大提高了性别特异分子标记的筛选精度。随着全基因组测序在水产动物中的普及和测序成本的降低, 高通量的基因组测序在鱼类性别特异标记的筛选中已经从参考工具发展为常用的技术手段, 再加上通过传统分子标记技术筛选性别特异标记技术的发展和经验的积累, 我国鱼类性别特异分子标记的研究进入快速发展期(表1), 在包括半滑舌鲷、黄颡鱼、条石鲷、尼罗罗非鱼、鲤、大口鲶、大黄鱼、乌鳢、平鲈、大刺鳅、黄姑鱼、翘嘴红鲌、金钱鱼、鳊、鲢、奥利亚罗非鱼、斑石鲷、圆斑星鲃、鳊、黄姑鱼、斑鳊、卵形鲳鲹、四棘金钱鱼、鲮鱼、香鱼、大口黑鲈、长吻鮠、弓背青鲮、光倒刺鲃等三十多种鱼类中筛选到性别特异分子标记。

鱼类性别特异分子标记的优化与鉴定应用 为了使性别特异分子标记更好进行产业化应用, 在一些养殖鱼类中, 性别特异分子标记及配套的遗传性别鉴定方法得到了优化。以半滑舌鲷

表 1 国内鱼类性别特异分子标记筛选一览表

Tab. 1 Reported fish sex-specific molecular markers by Chinese scientists

鱼类名称 name	拉丁学名 Latin name	性别决定类型 sex determination	标记类型 marker	参考文献 reference
半滑舌鳎	<i>C. semilaevis</i>	ZW-ZZ	AFLP	[11]
黄颡鱼	<i>P. fulvidraco</i>	XX-XY	AFLP	[14]
黄颡鱼	<i>P. fulvidraco</i>	XX-XY	SRAP	[16]
鲤	<i>C. carpio</i>	XX-XY	RAPD	[17]
圆斑星鲈	<i>Verasper variegatus</i>	ZW-ZZ	AFLP	[18]
奥里亚罗非鱼	<i>O. aureus</i>	XX-XY	RAPD	[19]
半滑舌鳎	<i>C. semilaevis</i>	ZW-ZZ	SSR	[13]
半滑舌鳎	<i>C. semilaevis</i>	ZW-ZZ	SSR	[20]
尼罗罗非鱼	<i>O. niloticus</i>	XX-XY	SNP	[21]
条石鲷	<i>Oplegnathus fasciatus</i>	X1X2Y	SSR	[22]
半滑舌鳎	<i>C. semilaevis</i>	ZW-ZZ	SCAR	[23]
半滑舌鳎	<i>C. semilaevis</i>	ZW-ZZ	DNA片段	[24]
大黄鱼	<i>Larimichthys crocea</i>	XX-XY	SNP	[25]
翘嘴红鲌	<i>Erythroculter ilishaeformis</i>	XX-XY	AFLP	[26]
鳗鲡	<i>Anguilla japonica</i>		SCAR	[27]
乌鳢	<i>Channa argus</i>	XX-XY	DNA片段	[28]
大黄鱼	<i>Larimichthys crocea</i>	XX-XY	DNA片段	[29]
黄姑鱼	<i>Nibea albiflora</i>	XX-XY	DNA片段	[30]
鲢	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	XX-XY	DNA片段	[31]
鳙	<i>Aristichthys nobilis</i>	XX-XY	DNA片段	[31]
翘嘴鳊	<i>Siniperca chuatsi</i>	XX-XY	DNA片段	[32]
斑鳢	<i>Channa maculata</i>	XX-XY	SNP	[33]
大刺鲃	<i>Mastacembelus armatus</i>	XX-XY	DNA片段	[34]
平鲉鱼类			SNP	[35]
大口鲶	<i>Silurus meridionalis</i>	XX-XY	DNA片段	[36]
斑石鲷	<i>Oplegnathus punctatus</i>	X1X2Y	DNA片段	[37]
卵形鲳鲹	<i>Trachinotus ovatus</i>	ZZ-ZW	SNP	[38]
金钱鱼	<i>Scatophagus argus</i>	XX-XY	DNA片段	[39]
香鱼	<i>Plecoglossus altivelis</i>	XX-XY	DNA片段	[40]
大口黑鲈	<i>Micropterus salmoides</i>	XX-XY	SNP	[41]
鮠鲂杂交种先锋2号	<i>Megalobrama amblycephala</i> × <i>Ancherythroculter nigrocauda</i>	XX-XY	DNA片段	[42]
岱衢族大黄鱼	<i>Larimichthys crocea</i>	XX-XY	DNA片段	[43]
长吻鲢	<i>Leiocassis longirostris</i>	XX-XY	DNA片段	[44]
长吻鲢	<i>Leiocassis longirostris</i>	XX-XY	DNA片段	[45]
四棘金钱鱼	<i>Scatophagus tetracanthus</i>	XX-XY	DNA片段	[46]
弓背青鲮	<i>Oryzias curvinotus</i>	XX-XY	DNA片段	[47]
光倒刺鲃	<i>Spinibarbus hollandi</i>	XX-XY	DNA片段	[48]
翘嘴鳊	<i>Siniperca chuatsi</i>	XX-XY	DNA片段	[49]
鲮鱼	<i>Cirrhinus molitorella</i>	XX-XY	DNA片段	[50]
斑点叉尾鲷	<i>Ictalurus punctatus</i>	XX-XY	DNA片段	[51]

为例, 研究表明半滑舌鳎存在自然性逆转现象, 在养殖群体中存在伪雄鱼, 这种伪雄鱼遗传性别为 ZW 雌性, 生理性别为雄性, 可产生精子并繁育后代。然而, 其后代中伪雄比例占 ZW 型鱼的 90% 以上, 导致雌性比例大为降低。因此, 在繁育前将雄性亲本进行遗传性别鉴定, 剔除伪雄鱼, 是培育半滑舌鳎高雌苗种的有效手段, 而利用性别特异分子标记在养殖场对雄性亲鱼进行快速性别鉴定就显得尤为重要。然而, 一般情况下养殖现场的实验条件恶劣, 方法有限, 鉴定速度和准确度难以保障。半滑舌鳎 AFLP 雌性特异标记是显性标记, 只能在 ZW 雌鱼中扩增出一个条带, 无法鉴别出由于 DNA 提取质量差而导致的假阴性结果; 而开发的半滑舌鳎微卫星性别特异标记, 在 Z 和 W 染色体上扩增的片段只有 12 bp 的差异, 适用于聚丙烯酰胺凝胶电泳分型, 这在养殖场难以实现。针对这种情况, 中国水产科学研究院黄海水产研究所陈松林团队从已开发的半滑舌鳎 SSR 性别特异分子标记中选择 Z 和 W 染色体中扩增到的片段相差最大的一个 (35 bp) 重新设计引物, 提高扩增片段中差异片段的占比, 同时选用较高浓度的琼脂糖, 提高小片段的分辨率, 成功开发出了可用于琼脂糖分型的适用于养殖场现场鉴定的半滑舌鳎性别特异标记。以这一标记为核心工具, 优化鉴定流程, 在保证质量的同时缩短 DNA 提取时间, 开发出了一套半滑舌鳎遗传性别快速鉴定方法, 大大提高了养殖现场遗传性别鉴定的速度, 并将鉴定结果准确率提高到 100%^[23]。此外, 陈松林团队还结合半滑舌鳎性别相关基因的研究, 开发出了差异片段为 113 bp 的性别特异标记, 进一步降低了适于鉴定的琼脂糖浓度, 提高了鉴定效率^[24]。在黄颡鱼中, 围绕开发的雄性特异标记, 也进行了性别鉴定流程的优化, 提升了性别鉴定效率, 为“全雄 1 号”、“全雄 2 号”新品种的研发提供了技术保证^[52]。

3 鱼类分子标记辅助性控育种

目前, 性别特异分子标记已经在部分鱼类性控育种中得到了应用, 并取得了显著的成效。如在半滑舌鳎良种培育过程中, 首先通过建立雄性候选亲本遗传性别现场快速鉴定技术, 剔除伪雄鱼, 保证了后代的高雌性比例在 40% 左右, 随后对高雌苗种结合家系选育与基因组选择育种技术, 培育出了抗哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 感染能力提高 30.9%、18 月龄体重平均提高 17.7%、养殖

成活率平均提高 15.7% 的高雌速生抗病半滑舌鳎新品种“鳎优 1 号”^[53]。

由于黄颡鱼具有明显的性别二态性, 在相同养殖条件下, 第一年雄性黄颡鱼比雌鱼的生长速率快约 30%, 在养殖的第二年, 雌雄生长差异接近 3 倍。黄颡鱼通过人工诱导, 可以得到 XY 型生理雌鱼, 进而繁育出 YY 型超雄鱼, 与 XX 型雌鱼交配即可建立黄颡鱼全雄繁育体系。黄颡鱼雄性特异标记的研发, 可以通过分子手段精准区分 XY 型正常雄鱼和 YY 型超雄鱼, 大大降低筛选 YY 型超雄鱼的工作量, 解决了黄颡鱼“全雄 1 号”、“全雄 2 号”等全雄新品种技术难点。黄颡鱼“全雄 1 号”比普通黄颡鱼增产 35%, 而 2023 年新通过审定的黄颡鱼“全雄 2 号”在相同养殖条件下, 12 月龄体重提高 12.42%^[54-56]。

尼罗罗非鱼和奥利亚罗非鱼是罗非鱼属中的两个不同物种, 分别为两种不同的性别决定类型, 尼罗罗非鱼是 XY 型, 奥利亚罗非鱼是 ZW 型。中国水产科学研究院珠江水产研究所使用分子标记辅助性控技术, 以选育的尼罗罗非鱼通过性逆转及测交得到超雄个体 (YYn♂), 再与选育的奥利亚罗非鱼雌性 (ZW) 杂交得到 WY 型雌鱼, 再与 YYn♂ 杂交获得超雄罗非鱼 YYa♂, 得到的 YYa♂ 作为父本, 连续 5 代选育的尼罗罗非鱼雌性作为母本, 所得子代即为“粤闽 1 号”新品种, 其自然雄性率达到 98.31%, 在相同养殖条件下, “粤闽 1 号”平均体重比同期养殖的吉富罗非鱼提高 23.77%, 父本超雄罗非鱼制种相对简单, 便于推广^[57]。

截止到 2023 年, 我国审定的水产新品种共计 283 个, 其中鱼类新品种 142 个, 包括半滑舌鳎“鳎优 1 号”、黄颡鱼“全雄 1 号”、“全雄 2 号”、虹鳟“全雌 1 号”、罗非鱼“鹭雄 1 号”、“粤闽 1 号”、“夏奥 1 号”、杂交鳊“雄鳊 1 号”、翘嘴鲮“鼎鳊 1 号”、翘嘴鲮“全雌 1 号”、黄姑鱼“全雌 1 号”等 11 个全雌/雄或高雌/雄水产新品种, 性别特异分子标记在这些新品种培育中起到了重要的作用。

4 展望

4.1 持续开发养殖鱼类性别特异分子标记

我国养殖鱼类物种众多, 具有巨大的开发潜力和推广前景。许多养殖鱼类存在性别差异现象, 有必要进行性别控制和单性育种技术研究。性别特异标记是进行性控育种的重要基础工具, 然而,

我国养殖鱼类性别特异标记开发尚不充分, 不能完全覆盖所有养殖鱼类的有关需求。近年来, 在全基因组测序技术的辅助下, 通过雌、雄个体的基因组重测序数据进行高通量比对, 作为一种有效的技术手段, 大大加快了养殖鱼类性别特异分子标记的开发进程。因此, 整合建立我国养殖鱼类全基因组测序平台, 集成基于基因组数据的鱼类性别特异标记筛选流程和技术体系, 预期将对进一步提高鱼类性别特异分子标记的开发效率和普及程度起到推动作用。

4.2 强化鱼类性别特异分子标记筛选方法创新

在脊椎动物中, 鱼类的进化地位较低, 性别决定机制复杂, 受到环境和遗传因素的共同影响。在基因组层面上, 有些鱼类没有性染色体, 有些鱼类的性别决定区域很小, 这为鱼类性别特异标记的筛选带来了困难。现有的筛选方法, 难以满足鱼类性别特异分子标记的研发需要, 如大菱鲆目前还没有找到有效的性别特异分子标记。因此, 针对鱼类基因组与性别决定机制的复杂现象, 创新筛选方法, 突破大菱鲆等鱼类的性别特异标记筛选难题, 或将成为未来鱼类性别特异标记筛选的重要研究方向。

4.3 优化鱼类性别特异分子标记的应用方法

性控育种是提高养殖鱼类产量的重要方法, 性别特异分子标记的研发为鱼类性控育种提供了有效工具。目前, 虽然我国科研人员在三十多种养殖鱼类筛选到性别特异分子标记, 然而已经应用于良种培育的性别特异标记还只有半滑舌鳎、黄颡鱼、罗非鱼、乌鳢、翘嘴鲈、黄姑鱼、虹鳟等少数鱼类, 其他大多数养殖鱼类中采用性别特异标记培育良种的研究仍有待突破。

在实际的性控育种工作中, 遗传性别的鉴定往往要在养殖场等简易实验条件下进行, 高效的鉴定流程、简单的鉴定方法和可靠的鉴定结果是更好实现性控育种目标的必要条件。因此, 在研发得到性别特异分子标记之后, 围绕性别特异分子标记, 结合高效核酸提取或分离技术, 建立简洁有效的鉴定技术流程, 将为养殖鱼类单性良种培育提供可靠的遗传性别鉴定技术手段。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

[1] Devlin R H, McNeil B K, Groves T D D, *et al.* Isolation <https://www.china-fishery.cn>

of a Y-chromosomal DNA probe capable of determining genetic sex in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*)[J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1991, 48(9): 1606-1612.

- [2] Allendorf F W, Gellman W A, Thorgaard G H. Sex-linkage of two enzyme loci in *Oncorhynchus mykiss* (rainbow trout)[J]. *Heredity*, 1994, 72(5): 498-507.
- [3] Iturra P, Medrano J F, Bagley M, *et al.* Identification of sex chromosome molecular markers using RAPDs and fluorescent in situ hybridization in rainbow trout[J]. *Genetica*, 1997, 101(3): 209-213.
- [4] Lee B Y, Penman D J, Kocher T D. Identification of a sex - determining region in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using bulked segregant analysis[J]. *Animal Genetics*, 2003, 34(5): 379-383.
- [5] Griffiths R, Orr K J, Adam A, *et al.* DNA sex identification in the three-spined stickleback[J]. *Journal of Fish Biology*, 2000, 57(5): 1331-1334.
- [6] Ezaz M T, Harvey S C, Boonphakdee C, *et al.* Isolation and physical mapping of sex-linked AFLP markers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) [J]. *Marine Biotechnology*, 2004, 6(5): 435-445.
- [7] 常重杰, 周荣家, 余其兴. 两种泥鳅不同群体遗传变异的 RAPD 分析[J]. *动物学报:英文版*, 2001, 47(1): 89-93.
- Chang C J, Zhou R J, Yu Q X. Genetic variation of two loach species revealed by RAPD analysis[J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2001, 47(1): 89-93 (in Chinese).
- [8] 宋平, 潘云峰, 向筑, 等. 黄颡鱼 RAPD 标记及其遗传多样性的初步分析[J]. *武汉大学学报:理学版*, 2001, 47(2): 233-237.
- Song P, Pan Y F, Xiang Z, *et al.* RAPD markers and genetic diversity in *Pelteobagrus fulvidraco*[J]. *Journal of Wuhan University (Natural Science Edition)*, 2001, 47(2): 233-237 (in Chinese).
- [9] 李建中, 刘少军, 张轩杰, 等. 异源四倍体鲫鲤雌雄差异的 RAPD 标记[J]. *水生生物学报*, 2004, 28(6): 674-676.
- Li J Z, Liu S J, Zhang X J, *et al.* RAPD marker of the difference between the male and female of allotetraploid crucian-carp[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, 28(6): 674-676 (in Chinese).
- [10] Ji X S, Liu H W, Chen S L, *et al.* Growth differences and dimorphic expression of growth hormone (GH) in female
中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- and male *Cynoglossus semilaevis* after male sexual maturation[J]. *Marine Genomics*, 2011, 4(1): 9-16.
- [11] 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(2): 273-280.
- [12] 周丽青, 杨爱国, 柳学周, 等. 半滑舌鲷染色体核型分析[J]. 水产学报, 2005, 9(3): 417-419.
Zhou L Q, Yang A G, Liu X Z, *et al.* The karyotype of the tonguefish *Cynoglossus semilaevis*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2005, 9(3): 417-419 (in Chinese).
- [13] 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: 120-128.
- [14] 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.
- [15] Chen S L, Zhang G J, Shao C W, *et al.* Whole-genome sequence of a flatfish provides insights into ZW sex chromosome evolution and adaptation to a benthic life-style[J]. *Nature Genetics*, 2014, 46(3): 253-260.
- [16] 辛文婷, 孙中武, 尹洪滨, 等. 黄颡鱼雌雄差异的 SRAP 标记[J]. 东北林业大学学报, 2009, 37(5): 112-113.
Xin W T, Sun Z W, Yin H B, *et al.* Identification of sex-associated SRAP marker in *Pelteobagrus fulvidraco*[J]. *Journal of Northeast Forestry University*, 2009, 37(5): 112-113 (in Chinese).
- [17] Chen J J, Wang Y L, Yue Y Y, *et al.* A novel male-specific DNA sequence in the common carp, *Cyprinus carpio*[J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2009, 23: 235-239.
- [18] Ma H Y, Chen S L, Yang J F, *et al.* Isolation of sex-specific AFLP markers in spotted halibut (*Verasper variegatus*)[J]. *Environmental Biology of Fishes*, 2010, 88(5): 9-14.
- [19] 杨玲, 孟庆磊, 李娴, 等. 一个奥利亚罗非鱼雌性特异性SCAR标记的建立[J]. 渔业科学进展, 2011, 32(4): 34-40.
Yang L, Meng Q L, Li X, *et al.* Establishment of a female specific SCAR marker in blue tilapia *Oreochromis aureus*[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2011, 32(4): 34-40 (in Chinese).
- [20] Song W T, Li Y Z, Zhao Y W, *et al.* Construction of a high-density microsatellite genetic linkage map and mapping of sexual and growth-related traits in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e52097.
- [21] 孙运倡. 尼罗罗非鱼性别特异分子标记的筛选、应用及性别决定候选基因 *sdY* 的分子克隆 [D]. 重庆: 西南大学, 2013.
Sun Y L. Screening, application of sex-specific molecular markers and cloning of candidate sex-determining gene *sdY* in Nile tilapia [D]. Chongqing: Southwest University, 2013 (in Chinese).
- [22] Xu D D, Lou B, Xu H X, *et al.* Isolation and characterization of male-specific DNA markers in the rock bream *Oplegnathus fasciatus*[J]. *Marine Biotechnology*, 2013, 15(2): 221-229.
- [23] 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).
- [24] 董忠典, 张宁, 徐文腾, 等. 一种快速鉴定半滑舌鲷遗传性别的方法[J]. 农业生物技术学报, 2016, 24(5): 764-769.
Dong Z D, Zhang N, Xu W T, *et al.* A rapid method for genetic sexuality identification in *Cynoglossus semilaevis*[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2016, 24(5): 764-769 (in Chinese).
- [25] 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.
- [26] 刘祥芳, 郑建波, 贾永义, 等. 翘嘴红鲌雌雄基因组差异及太湖野生群体遗传多样性现状的AFLP分析[J]. 水生生物学报, 2017, 41(6): 1200-1206.
Liu X F, Zheng J B, Jia Y Y, *et al.* AFLP analysis on genomic sexual dimorphism of *Erythroculter ilishaeformis* and current genetic diversity of the Taihu strain[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2017, 41(6): 1200-1206 (in Chinese).

- [27] 张利娜. 长江口降海鳗鲡雌雄判别方法及雌性特异 SCAR 标记的建立 [M]. 上海: 上海海洋大学, 2017.
Zhang L N. Establishment of the method of sex discrimination and the female specific SCAR marker in migratory eels (*Anguilla japonica*) collected at the Yangtze River Estuary[M]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2017 (in Chinese).
- [28] 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.
- [29] Lin X Y, Xiao S J, Li W B, *et al.* Development and validation of sex-specific SNP markers in *Larimichthys crocea*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(9): 1329-1337.
- [30] Sun S, Li W B, Xiao S J, *et al.* Genetic sex identification and the potential sex determination system in the yellow drum (*Nibea albiflora*)[J]. *Aquaculture*, 2018, 492: 253-258.
- [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 (*Hypophthalmichthys nobilis*) and silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*)[J]. *Dna Research*, 2018, 25(3): 257-264.
- [32] 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.
- [33] Yang C, Huang R, Ou M, *et al.* A rapid method of sex-specific marker discovery based on NGS and determination of the XX/XY sex-determination system in *Channa maculate*[J]. *Aquaculture*, 2020, 528: 735499.
- [34] Xue L Z, Guo X F, Zhou Y L, *et al.* Screening and characterization of sex-specific markers by 2b-RAD sequencing in zig-zag eel (*Mastacembelus armatus*) with implication of XY sex determination system[J]. *Aquaculture*, 2020, 528: 735550.
- [35] 贺艳, 齐洁, 张全启, 等. 一种平鲷鱼类性别特异分子标记引物, 鉴别方法及其应用: 中国, CN201910552090.8[P]. 2019-08-27.
He Y, Qi J, Zhang Q Q, *et al.* Identification method and application of a sex-specific molecular marker primer for Scorpaenopsis: China, CN201910552090.8 [P]. 2019-08-27(in Chinese).
- [36] 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.
- [37] Li M, Zhang R, Fan G Y, *et al.* Reconstruction of the origin of a Neo-Y sex chromosome and its evolution in the spotted knifejaw, *Oplegnathus punctatus*[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2021, 38(6): 2615-2626.
- [38] Guo L, Yang J W, Liu B S, *et al.* Colinearity based sex-specific marker development in the golden pompano (*Trachinotus ovatus*)[J]. *Aquaculture*, 2021, 544: 737044.
- [39] 黄远青, 江东能, 李广丽, 等. 一种鉴定金钱鱼遗传性别的特异性分子标记及其引物和应用: CN202010986812.3 [P]. 2023-07-21.
Huang Y Q, Jiang D N, Li G L, *et al.* A sex-specific marker, primer and application for identification genetic sex of argus fish: China, CN202010986812.3[P]. 2023-07-21 (in Chinese).
- [40] Li S Y, Xu L Q, Shi Y H, *et al.* Male-specific markers developed by next-generation sequencing confirmed an XX/XY sex-determination system in farmed ayu (*Plecoglossus altivelis*)[J]. *Aquaculture*, 2021, 541: 736822.
- [41] Du J X, Zhou J H, Li S J, *et al.* A PCR-based method for genetic sex identification and evidence of the XX/XY sex determination system in largemouth bass (*Micropterus salmoides* L.) [J]. *Aquaculture*, 2021, 545: 737220.
- [42] Zhang S Q, Xiong X M, Shi R H, *et al.* Screening and characterization of sex-specific markers for the hybrid (*Megalobrama amblycephala* ♀ × *Ancherythroculter nigrocauda* ♂) based on 2b-RAD and transcriptome sequencing[J]. *Aquaculture*, 2022, 548: 737704.
- [43] Yu M, Xie Q P, Wei F L, *et al.* Development and identification of a sex-specific molecular marker in Dai-qu stock large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[J]. *Aquaculture*, 2022, 555: 738172.
- [44] Dai S M, Zhou Y L, Guo X F, *et al.* Sex-specific markers developed by genome-wide 2b-RAD sequencing confirm an XX/XY sex determination system in Chinese longsnout catfish (*Leiocassis longirostris*)[J]. *Aquaculture*, 2022, 549: 737730.
- [45] Luo H, Li Y, Zheng S Q, *et al.* Identification of male sex-specific markers using genome re-sequencing in the Chinese longsnout catfish *Leiocassis longirostris*[J]. 中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- Aquaculture*, 2022, 558: 738392.
- [46] Peng Y X, Huang Y Q, Zhong J, *et al.* Identification of sex-linked marker and candidate sex determination gene in ornamental fish, African scat (*Scatophagus tetracanthus*)[J]. *Aquaculture*, 2023, 563: 739023.
- [47] 王中锋, 何传猛, 姚泽彬, 等. 全基因组重测序筛选弓背青鲮三亚群体性别遗传标记[J]. 广东海洋大学学报, 2023, 43(4): 69-75.
- Wang Z D, He C M, Yao Z B, *et al.* Screening of sex genetic markers in the sanya population of *Oryzias curvinotus* by whole-genome resequencing[J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2023, 43(4): 69-75 (in Chinese).
- [48] Han C, Huang W W, Peng S H, *et al.* Screening and characterization of sex-specific markers by NGS sequencing in *Spinibarbus hollandi* with implication of XY sex determination system[J]. *Aquaculture*, 2023, 565: 739147.
- [49] Liu S Y, Han C, Huang J J, *et al.* Screening and characterization of X chromosome-specific markers in mandarin fish (*Siniperca chuatsi*)[J]. *Aquaculture*, 2023, 562: 738833.
- [50] Liu H Y, Xia W W, Li B J, *et al.* Sex-specific markers developed by 2b-RAD and genome sequencing reveal an XX/XY sex-determination system in mud carp (*Cirrhinus molitorella*)[J]. *Aquaculture*, 2023, 565: 739131.
- [51] Liao Q, Gong G R, Wang J Q, *et al.* Identification of sex-linked codominant markers and development of a rapid LAMP-based genetic sex identification method in channel catfish (*Ictalurus punctatus*)[J]. *Aquaculture*, 2023, 572: 739556.
- [52] 田华, 管波, 徐江, 等. 黄颡鱼早期性别鉴定技术的优化及其应用研究[J]. *科学养鱼*, 2019(9): 70-72.
- Tian H, Guan B, Xu J, *et al.* Optimization and application of early sex identification technique for *Pelteobagrus pelteobagrus*[J]. *Scientific Fish Farming*, 2019(9): 70-72 (in Chinese).
- [53] 卢昇, 李仰真, 王磊, 等. 基因组选择技术在半滑舌鳎“鲮优1号”新品种培育中的应用研究[J]. 水产学报, 2022, 46(8): 1305-1312.
- Lu S, Li Y Z, Wang L, *et al.* Application of genomic selection in the breeding of new variety of Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) “Tayou No. 1”[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2022, 46(8): 1305-1312 (in Chinese).
- [54] 唐德文, 范红深, 段春生, 等. 黄颡鱼“全雄1号”与黄颡鱼饲养效果对比分析[J]. 淡水渔业, 2014, 44(1): 102-105.
- Tang D W, Fan H S, Duan C S, *et al.* Contrast research on cultivating of “Quanxiong No. 1” and ordinary yellow catfish[J]. *Freshwater Fisheries*, 2014, 44(1): 102-105 (in Chinese).
- [55] 田华, 陈延奎, 陈丽慧, 等. 黄颡鱼“全雄1号”鱼苗池塘培育技术研究[J]. 科学养鱼, 2013(3): 10-12.
- Tian H, Chen Y K, Chen L H, *et al.* Research on pond breeding technology of yellow catfish “Quanxiong No. 1” fry[J]. *Scientific Fish Farming*, 2013(3): 10-12 (in Chinese).
- [56] 谢满华, 李珺, 李自宝. 黄颡鱼“全雄1号”苗种培育试验技术[J]. 中国水产, 2015(8): 92-93.
- Xie M H, Li J, Li Z B. Breeding experiment of yellow catfish “Quanxiong No. 1” seed[J]. *Fisheries of China*, 2015(8): 92-93 (in Chinese).
- [57] 王淼, 祁文龙, 高菲菲, 等. 罗非鱼“粤闽1号”不同养殖模式养殖效果分析[J]. 科学养鱼, 2019(5): 18-19.
- Wang M, Qi W L, Gao F F, *et al.* Analysis on effect of different culture models in tilapia ‘Yuemin No 1’[J]. *Scientific Fish Farming*, 2019(5): 18-19 (in Chinese).

Fish sex-specific molecular marker screening and marker-assisted sex-controlled breeding: history, progress and prospect

LIU Yang^{1,2,3}, CHEN Songlin^{1,2,3*}

(1. State Key Laboratory of Mariculture Biobreeding and Sustainable Goods, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. Shandong Key Laboratory of Marine Fisheries Biotechnology and Genetic Breeding, Qingdao 266071, China;

3. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao 266071, China)

Abstract: Sex-controlled breeding is a powerful technique in aquaculture organisms. China has made great progress in sex determination research and sex-controlled breeding in fish in the last 20 years. Firstly, the authors reviewed the research history of sex-specific molecular markers in fish in China, including the exploration period (2001-2006), breakthrough period (2007-2012) and rapid development period (2013-2023). Especially in the breakthrough period, the research and development of sex-specific markers for *Cynoglossus semilaevis* and *Pelteobagrus fulvidraco*, which provided important technical means for sex determination research and sex-controlled breeding of fish in China. Secondly, the research progress of molecular marker-assisted sex-controlled breeding was introduced. Sex-specific molecular markers have been used to breed new fish species, such as *C. semilaevis* "Tayou No.1", *P. fulvidraco* "Quanxiong No.1", which greatly promoted the research on sex-controlled breeding of fish in China. Finally, the author prospected the future development direction of sex-specific molecular marker screening and marker-assisted sex-controlled breeding in China, and proposed research focuses on fish sex-controlled breeding in fish in the future. The paper will have important significance for sex determination research and sex-controlled breeding of fish in China.

Key words: fish; sex-specific molecular marker; sex-controlled breeding; research history; research progress; prospect

Corresponding author: CHEN Songlin. E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (32230107); Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020TD20); Taishan Scholar Climbing Project Fund of Shandong, China