

doi: 10.7541/2016.145

黄河鲤性别决定时间和相关基因表达研究

贾永芳 张弯弯 张瑞华 梁婷婷 杜启艳 常重杰

(河南师范大学生命科学学院, 新乡 453007)

摘要: 鱼类性别决定和分化机制极为复杂, 通过性腺组织切片鉴定得出黄河鲤从未分化性腺发育为Ⅱ期精巢、卵巢的时间为受精后第40天到第80天。选取一些可能参与黄河鲤性别决定分化相关的基因(*amh*、*ar*、*cyp19a*、*cyp19b*、*dax1*、*dmrt1*、*er*、*foxl2*、*nobox*、*sox9a*、*sox9b*、*zp2*)进行实时荧光定量PCR分析各个基因在受精后40d、45d、50d、55d、65d和80d的表达情况。结果显示性别决定相关基因在50d都有高表达, 推测45—50 d为性别决定的关键时间。*ar*、*amh*、*dax1*、*dmrt1*、*sox9a*、*sox9b*六个基因在80d雄性表达量升高, 且雄性明显高于雌性, 推测这些基因参与精巢分化发育过程。*cyp19a*、*cyp19b*、*foxl2*、*nobox*、*zp2*五个基因在80d雌性表达升高, 且高于雄性, 推测其可能参与卵巢分化发育。

关键词: 性别决定; 性别分化; 黄河鲤

中图分类号: Q344⁺.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2016)06-1121-07

性别发育包括性别决定和性别分化, 由性别决定机制触发并调节性别分化基因的表达, 形成一个复杂的遗传网络, 最终成为雄性或雌性表型^[1]。目前, 对鱼类性别决定和分化机制的认识已经进入基因水平, 鱼类基因组中的性别决定与分化相关基因多数通过同源克隆方法获得, 随后进行功能研究和验证^[2]。在脊椎动物中, 位于Y染色体的*sry*基因成为哺乳动物雄性决定启动基因^[3], 在哺乳动物中已报道众多性别决定基因, 包括*Sox9* (*Sry*-related high mobility group-box gene)、*Dax1* (*Dosage sensitive sex reversal in Adrenal Hypoplasia Congenita critical region on X chromosome*)、*CYP19* (*Cytochrome P450 aromatase*)、*Dmrt1* (*Double-sex and mab-3 related transcription factor*) 和 *Amh* (*Anti-Mullerian hormone*)等, 他们在多种脊椎动物中也被克隆获得^[4, 5], 如硬骨鱼青鳉中*DMY*基因^[6]、虹鳟中*SDY*基因^[7]、银汉鱼中*Amhy*基因等^[8]。鱼类性别决定机制复杂多样, 各自的性别决定机制和性别决定

基因不尽相同。另外一些性别分化相关基因呈现出精巢或者卵巢的特异性表达, 如*ar* (*Androgen receptor*)和*er* (*Estradiol receptor*)在鸡睾丸中高度表达^[9], *foxl2* (*Forkhead box L2*)已被证明是雌性发育过程中的一个关键因子, 是目前发现的脊椎动物卵巢决定和分化的一个标志性启动基因^[10], *nobox* (*Newborn ovary homeobox gene*)在生殖细胞特异性表达, 是有关早期卵子发生的关键性转录调控因子^[11], *zp2* (*Zona pellucida*)则在小鼠不同阶段卵泡颗粒层细胞特异表达, 与卵巢发育相关^[12]。多数性别决定基因是指在性腺发育初期表达情况有明显波动, 表达量较高, 之后呈直接降低模式或者在幼鱼时期有所保持, 基因表达波动的时间点也标志着性腺初始发育的时间点^[13], 如青鳉中*dmy/dmrt1bY*基因^[14]; 性别分化基因则指在性腺发育初期有所表达, 随着精巢或者卵巢的分化表达量出现高峰直到发育成熟^[13], 如罗非鱼和中华鳖中*dmrt1*基因^[15—17]。

黄河鲤(*Cyprinus carpio* var.), 原产于黄河水域,

收稿日期: 2015-10-07; 修订日期: 2016-01-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号31200923和U1204329); 河南省科技厅基础与前沿技术项目(编号142300410164); 河南省科技厅科技攻关项目(编号142102310045); 河南省教育厅自然科学基金项目(编号14A180031)资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31200923 and U1204329); Henan Scientific and Technological Research Projects (No. 142300410164); Key Scientific and Technological Project of Henan Province (No. 142102310045); Natural Science Project of the Education Department of Henan Province (No. 14A180031)]

作者简介: 贾永芳(1978—), 女, 河南卫辉人; 博士研究生, 副教授; 主要从事分子遗传学研究。E-mail: jyf324@126.com

通信作者: 常重杰(1965—), 男, 河南许昌人; 博士, 教授, 博士生导师; 主要从事分子遗传学研究。E-mail: changzhongjie@tom.com

是我国北方的主要淡水养殖品种^[18],也是河南的特色鲤,其性别决定机制尚不清楚。目前鱼类性别决定的研究主要集中在单个基因的克隆及表达模式分析^[19],斑马鱼中已开展了多个性别相关基因的表达分析^[20],但借助基因的表达差异对性别决定时间进行推测报道较少^[13],本文结合目前的研究进展,通过分析性别决定相关基因在黄河鲤性腺不同发育时间的表达差异,对黄河鲤性别决定时间、雌雄分化基因进行推测,为深入了解黄河鲤性别决定和分化的分子调控机制提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 材料

所用黄河鲤幼鱼取自河南师范大学生命科学学院水产养殖场。挑选体质健康,无伤,无病,发育成熟的3龄黄河鲤,经过人工催产,授精得到受精卵饲养成幼鱼,用水为充分曝气的自来水,试验期间水温20—25℃,pH 6.5—7.5,溶氧量5.5—6.5 mg/L。分别在40、45、50、55、65和80d从黄河鲤中挑选健康活泼和体表无损的个体各15条。

1.2 组织切片的制备

在无菌条件下,借助体视显微镜(OLYMPUS SZ61)从黄河鲤幼鱼取出鲤性腺组织,4%多聚甲醛固定后储存在70%的酒精中,乙醇脱水,石蜡包埋,苏木精-伊红(HE)染色。在光学显微镜下(OLYMPUS BX51)观察,记录和分析。

1.3 总RNA的提取

在无菌条件下,幼鱼借助体视显微镜(OLYMPUS SZ61)取出鲤性腺组织,40—65d未能区分鲤性别故随机取材,80d时依据组织切片区分雌雄分别取材,每一个发育时间点取3组重复,每组5条仔鱼。取出组织后在液氮中快速研磨以及RNAiso reagent (TaKaRa, Japan)试剂盒抽提总RNA,取1 μg总RNA使用Primer Script Reverse Transcriptase (TaKaRa, Japan)试剂盒反转录合成cDNA。

1.4 引物的设计和检测

根据黄河鲤*amh*、*ar*、*cyp19a*、*cyp19b*、*dax1*、*dmrt1*、*er*、*foxl2*、*nobox*、*sox9a*、*sox9b*、*zp2*基因的序列设计特异性引物(表1),目标片段为120—300 bp,并通过RT-PCR扩增测序检查引物的特异性,PCR扩增程序如下:94℃,3min;94℃,30s;55℃,30s;72℃,1min共进行35个循环,72℃,5min延伸。得到目的条带单一明亮,测序结果和预期一致。

1.5 实时荧光定量PCR反应体系及条件

在实时PCR检测系统(LightCycler96[®], Roche)

进行实时荧光定量PCR,以40、45、50、55、65和80d的黄河鲤性腺cDNA为模板,通过对持家基因稳定性比对分析选出40S(40S ribosomal protein S11)为内参基因,反应体系20 μL。每个实验运行一式三份,其中包括内参基因和一个阴性对照RNA。实时荧光定量PCR反应条件如下:95℃变性10min,进行如下40个循环:95℃变性15s,60℃退火1min。之后温度以0.2s的速度从65℃到95℃逐渐升高,形成溶解曲线。

1.6 数据分析

记录下仪器(LightCycler96[®], Roche)自动给出的每个样本的 C_t 值,通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法对数据进行处理,用SPSS16.0软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA), $P<0.05$ 则认为差异达到显著水平, $P<0.01$ 则认为差异达到极显著水平。使用SigmaPlot 10.0作图。

2 结果

2.1 性腺组织学结果

黄河鲤性腺组织切片如图1所示,40d性腺中包含未分化性腺标志性的原始生殖细胞,其为椭圆形,细胞核偏大嗜酸,周围环绕着一层体细胞,体细胞呈梭形,即此时处于未分化性腺时期。80d性腺在组织学上出现明显的分化,雌性性腺呈现Ⅱ期卵巢特征,出现卵巢板,内含有圆形较大的初级卵母细胞,细胞质与细胞核比例相当,核膜的内壁有核仁。雄性性腺则呈现Ⅱ期精巢特征,其中大量的精原细胞存在于精巢中,呈圆形小颗粒状,胞质弱嗜酸性,体细胞包围在精原细胞周围,有些形成精原细胞索。少数嗜碱性颗粒状的初级精母细胞已经产生,体积较小,嗜碱性(图1)。

2.2 性腺形态发生前相关基因的表达

12个性别决定相关基因中共有10个基因在50d表达量出现升高,后又降低(图2、图3)。其中,*ar*、*amh*、*er*、*cyp19a*从第45天开始有升高趋势,50d继续升高;*dmrt1*、*zp2*、*foxl2*在50d表现出微弱的升高;*dax1*和*sox9a*在50d时急剧升高;而*sox9b*在第45天就出现表达高峰,在50d有所下降。组织学上,40d性腺处于未分化时期,遗传学上,在45—50d性别决定相关基因表达出现剧烈波动,其中10个基因在50d都有高表达。

2.3 雄性性别分化相关基因的表达

ar、*amh*、*dax1*、*dmrt1*、*er*、*sox9a*、*sox9b*七个基因在80d雄性性腺中表达量升高(图2)。其中*ar*在65d表达量出现波动,但在80d雌雄之间出现明显表达差异,*er*在80d雌雄差异不明显;*dax1*、*sox9a*

表 1 实时荧光定量PCR所用基因的特异性引物

Tab. 1 Primers used for real-time PCR

基因Gene	引物序列Primer sequence (5'-3')	片段大小Product size (bp)	注册号Accession
<i>amh</i>	CAGAAGGAGAGGACGAGGAA	207	KU168255
	GCTCTGAAGCCGACACTGAC		
<i>ar</i>	CCTGCCTAATCTGCTCTG	130	KU168254
	TCATCTGTCCAATCTTCCTC		
<i>cyp19a</i>	TCTCTTATGCTTCCTGTGAA	120	EU375455
	ACTTACTGCGGTGTATTGT		
<i>cyp19b</i>	TGTCCTGAGTGGTCTGTGAACT	129	EU499382
	CGGGTCTCCAGAAATCGGTAGA		
<i>dax1</i>	GGTGGCCGGTCTCTTCTTCAAAAC	105	KF703999
	CCATTCACTGCAAACCTGCC		
<i>dmrt1</i>	TTCGTGTCACCGCTGAAG	310	DQ241767
	GCTCTGAGATGATGGTAACG		
<i>er</i>	TGGATAGGAGTGAAGGAGAA	109	AB334722
	TGGACTGGAGCAGAATGA		
<i>foxl2</i>	GCCTATGTCCTATACCTCCTGTG	211	KP764768
	CTCATGCCGTTGTAAGTGTTC		
<i>nobox</i>	TACGATGGTCCATGTCCTCT	113	KU168253
	CTCTTGAACTCCTGTGACTCCT		
<i>sox9a</i>	GGAAGCTCGCGGATCAATAC	117	AY205252
	TGATCTTTCTGTGCTGAACC		
<i>sox9b</i>	CAGTATCCACACCTGCACAA	126	AY205251
	CTCGGCCTCCTCCACAAAT		
<i>zp2</i>	AGATGCAGAAGCCAGTTCAA	249	Z72493
	CCAGCAGTTTCAGAAGCCA		
40S	CCGTGGGTGACATCGTTACA	101	AB012087
	TCAGGACATTGAACCTCACTGTCT		

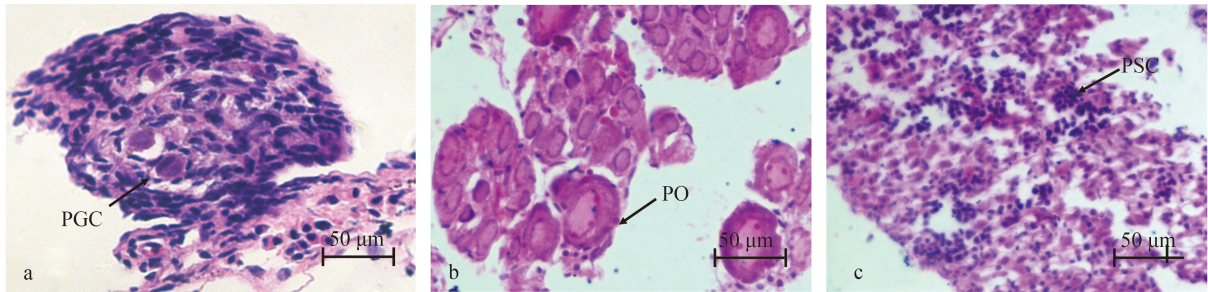


图 1 黄河鲤早期性腺发育形态特征

Fig. 1 The morphology of early gonad development in Yellow River carp

a. 未分化的性腺; b. 卵巢Ⅱ期; c. 精巢Ⅱ期; PGC. 原始生殖细胞; PO. 初级卵母细胞; PSC. 初级精母细胞

a. undifferentiated gonad; b. Stage II; c. Stage II; PGCs. primordial germ cells; PO. primary oocytes; PSC. primary spermatocytes

和*sox9b*表达模式相似, 均为自55d表达下降后表达趋于平稳, 在80d雄性开始升高, 雄性中表达量高于雌性; *dmrt1*在80d雄性中表达量剧增, 和80d雌性相比达到极显著差异; *amh*在80d雄性中表达也迅速升高。

2.4 雌性性别分化相关基因的表达

cyp19a、*cyp19b*、*foxl2*、*nobox*、*zp2*五个基因在80d雌性性腺中表达量升高, 且高于雄性(图 3)。*cyp19a* 表达量在65d开始逐渐升高, 在80d雌性中表达量达到高峰, 且明显高于80d雄性; *cyp19b*、*foxl2*、

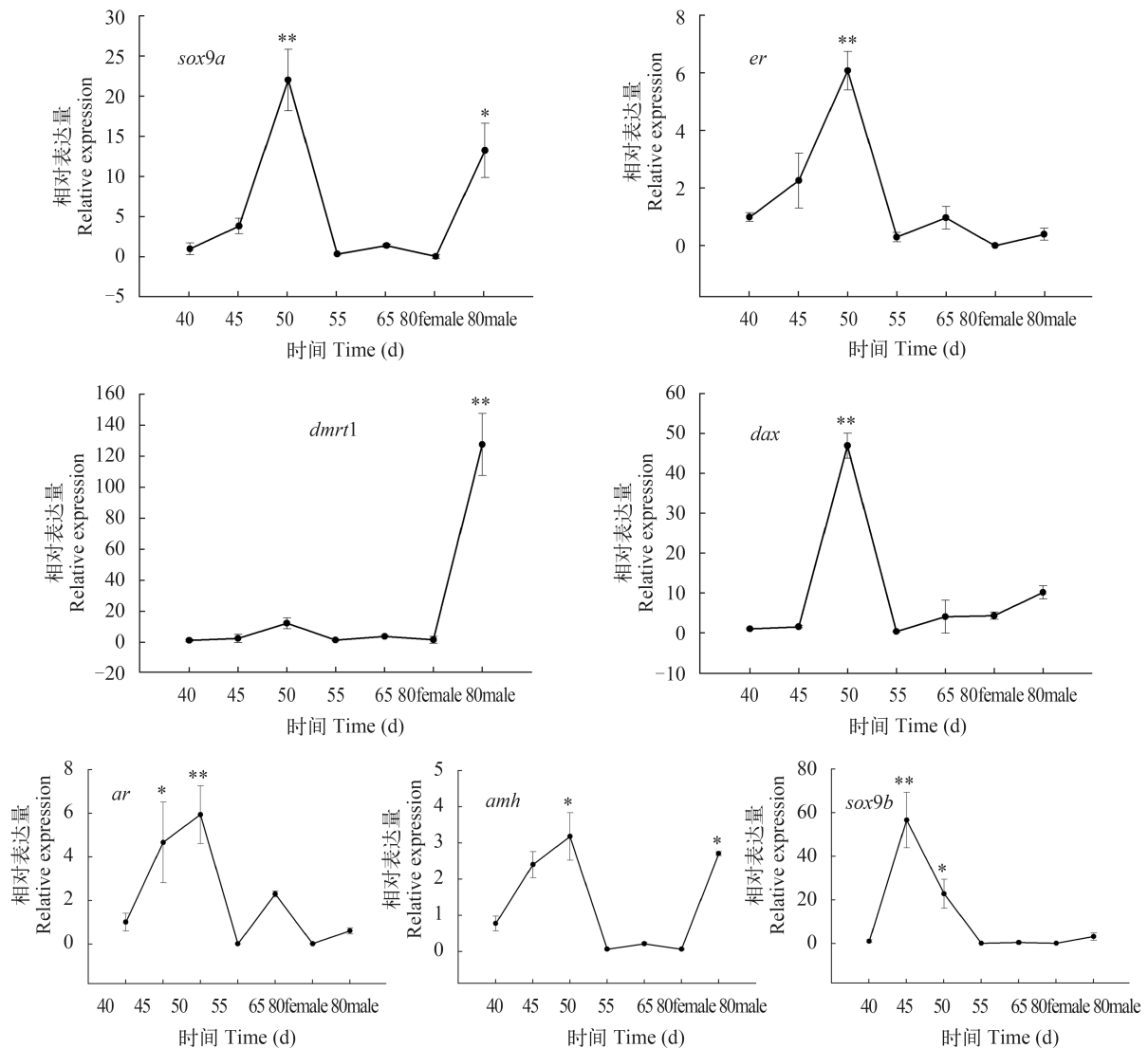


图2 *amh*、*ar*、*dax1*、*dmrt1*、*er*、*sox9a*、*sox9b*基因在黄河鲤不同发育时期的表达情况

Fig. 2 The mRNA expression of *amh*, *ar*, *dax1*, *dmrt1*, *er*, *sox9a* and *sox9b* during different stages of embryogenesis of Yellow River Carp

“*”表示与40d该基因表达量相比差异显著 ($P < 0.05$); “**”表示与40d该基因表达量相比差异极显著 ($P < 0.01$); 下同

“*”, $P < 0.05$ compared with 40d; “**”, $P < 0.01$ compared with 40d; the same applies below

nobox、*zp2*同样地在65d表达量开始升高,直至80d时雌性与雄性相比差异达到极显著。由此可以推测*cyp19a*、*cyp19b*、*foxl2*、*nobox*、*zp2*可能参与雌性性别分化发育。

3 讨论

在幼鱼发育过程中,可以通过检测性别决定相关基因在性腺中的表达以期推测性别决定和分化的时间。在尼罗罗非鱼中,性腺发育相关基因的表达得到了研究^[21, 22]。伯氏妊丽鱼因为体型较小难以单独分离性腺,则以整个躯干作为检测目标,以确保内含性腺,分析了23个候选基因的表达差异,得出*wnt4B*和*wt1A*为其早期性腺标记基因^[14]。本文

通过组织学观察初步确定黄河鲤从未分化性腺发育为精巢和卵巢的时间段,继而评估多个性别分化相关基因的表达水平。

通过组织学切片观察发现黄河鲤40d性腺为未分化性腺,在50d时性别决定相关基因表达量出现明显波动,其中一些基因从45d即有升高的趋势,说明在受精后45—50d可能是黄河鲤性别决定的关键时间。而斑马鱼性成熟一般需3个月,但是性别分化的时间大约在受精后21—23d^[23],尼罗罗非鱼则在受精后22—24周达到性成熟,其胚胎发育为卵巢或者精巢的关键时间在9—15d^[16, 24],伯氏妊丽鱼性成熟时间为受精后13—14周,在11—12d时为性别分化关键时间^[14],众多差异主要是因为鱼类的性别

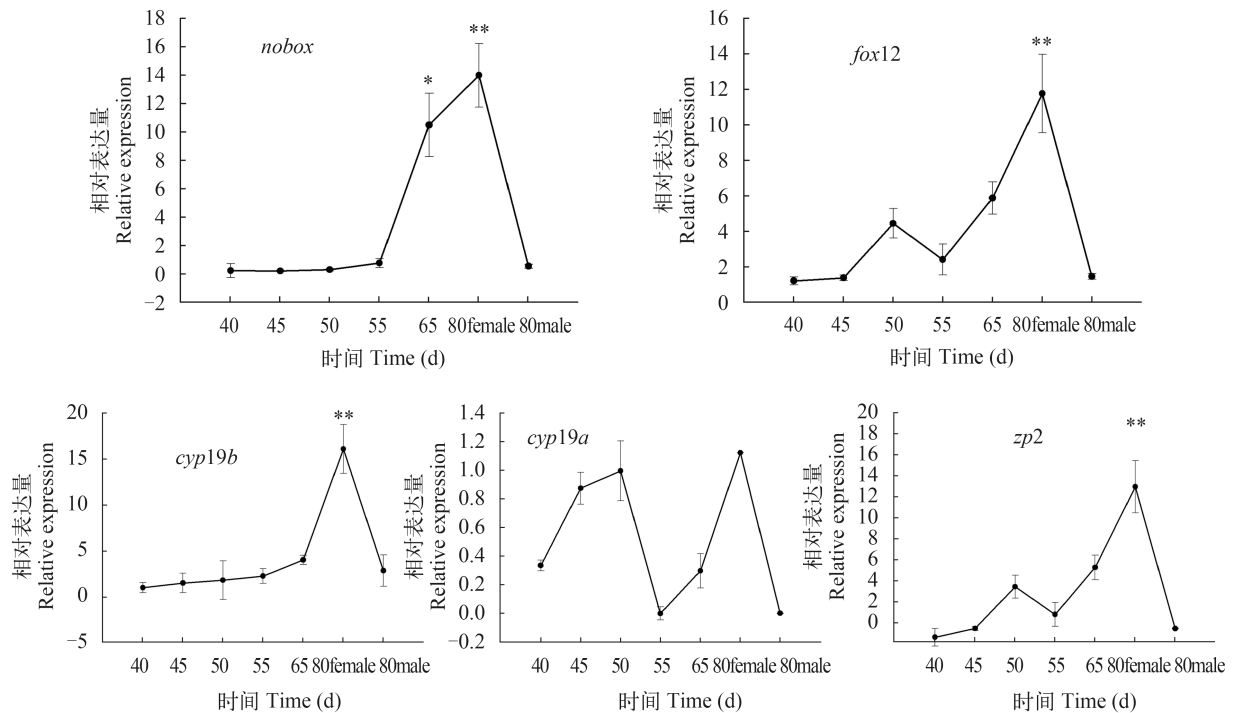


图3 *cyp19a*、*cyp19b*、*foxl2*、*nobox*、*zp2*基因在黄河鲤不同发育时期的表达情况

Fig. 3 The mRNA expression of *cyp19a*, *cyp19b*, *foxl2*, *nobox* and *zp2* during different stages of embryogenesis of Yellow River Carp

决定机制复杂多变,不同的硬骨鱼体重、体长和生长周期各不相同,而且没有一个普遍的模式,性别发育也主要以遗传因素为基础,受到环境和自身内分泌调节的影响^[25]。黄河鲤三年达到性成熟,根据本实验相关基因表达情况推测其性别决定的关键时间可能是受精后45—50d。

80d黄河鲤性腺切片观察可明显区分雌雄差异,雌性性腺发育为体积较大的初级卵母细胞,雄性为颗粒微小的初级精母细胞。同时,对性别决定相关基因的表达定量发现*amh*、*ar*、*dax1*、*dmrt1*、*sox9a*、*sox9b*基因在80d黄河鲤雄性性腺中表达有显著的升高,而*er*未表现出明显的雌雄差异。其中*ar*为雄激素受体基因;杜启艳等人通过半定量发现鲤*sox9*基因在脑和精巢中表达最为丰富^[19]; *dmrt1*在斑马鱼幼苗的性别决定和性别分化中有重要的功能,可以作为雄鱼的胚胎期指示基因^[26], *dmrt1*也是胡子鲶精巢特异性表达基因,已证明可能与胡子鲶的雄性性别决定、精子发生及精巢发育密切相关^[27]。另外, *amh*是银汉鱼中候选的性别决定关键基因^[8],在罗非鱼中研究发现*amh*在雄性幼鱼、成鱼中表达量显著高于雌鱼,雄性幼鱼*amh*表达量是成鱼的10倍^[28]。*ar*、*amh*、*dax1*、*dmrt1*、*sox9a*、*sox9b*基因在多种鱼类中发现与精巢发育相关,在80d雄性黄河鲤中表达量显著高于雌鱼,推测这些基因参与黄河鲤雄性性别分化发育过程。

cyp19a、*cyp19b*、*foxl2*、*nobox*、*zp2*基因在80d黄河鲤雌性性腺表达中有显著的升高。在斑马鱼中, *cyp19a*基因在胚胎期表达水平较低,差异不显著; *cyp19b*基因在16—24d性别分化的关键时期,表达量迅速升高,对维持雌性的发育方向具有重要作用^[20];在黄河鲤中, *cyp19a*的表达模式与斑马鱼相似,在55—80d表达量有波动,雌性表达高于雄性,但是差异不显著, *cyp19b*则呈现雌性表达量显著高于雄性,类似斑马鱼。另外小鼠*zp2*基因在小鼠卵泡颗粒细胞层以及卵母细胞特异表达^[12]; *foxl2*在青鳉也被报道与卵巢发育相关,分布在卵巢膜细胞^[29]。5个基因在其他鱼类中均表现出与卵巢发育相关,且在黄河鲤雌性个体表达量高于雄性,特别是*cyp19b*、*foxl2*、*nobox*、*zp2*基因,雌雄相比表达量差异显著,推测这些基因可能参与雌性性别分化发育。

据本次实验结果分析黄河鲤性别决定的关键时间为受精后45—50d。*ar*、*amh*、*dax1*、*dmrt1*、*sox9a*、*sox9b*六个基因可能参与黄河鲤雄性性别分化发育过程, *cyp19a*、*cyp19b*、*foxl2*、*nobox*、*zp2*五个基因可能参与其雌性性别分化发育。鱼类性别决定和分化多样而复杂,这一研究将为黄河鲤性别决定机制和发育进程提供基础信息,扩大对鱼类性别决定和分化的了解。

参考文献:

- [1] Devlin R H, Nagahama Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences [J]. *Aquaculture*, 2002, **208**(3): 191—364
- [2] Zheng Y, Wang Z Z, Chen J Z. Progresses on the study of sex differentiation genes in fish [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, **39**(4): 798—810 [郑尧, 王在照, 陈家长. 调控鱼类性腺分化基因的研究进展. 水生生物学报, 2015, **39**(4): 798—810]
- [3] Arezo M J, Papa N, Guttierrez V, *et al.* Sex determination in annual fishes: Searching for the master sex-determining gene in *Austrolebias charrua* (Cyprinodontiformes, Rivulidae) [J]. *Genetics and Molecular Biology*, 2014, **37**(2): 364—374
- [4] Guo W J, Yu X M, Tong J G. Cloning and sequence evolution analysis of *Sox* genes in bighead carp (*Aristichthys nobilis*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, **38**(4): 664—668 [郭稳杰, 俞小牧, 童金苟. 鳙*Sox*基因克隆及序列进化分析. 水生生物学报, 2014, **38**(4): 664—668]
- [5] Adriana PM, Yan Y L, Bremiller R A, *et al.* Characterization and expression pattern of zebrafish anti-Mullerian hormone (*Amh*) relative to *Sox9a*, *Sox9b* and *Cyp19a1a*, during gonad development [J]. *Gene Expression Patterns Gep*, 2005, **5**(5): 655—667
- [6] Kuramochi-Miyagawa S, Kimura T, Ijiri T W, *et al.* Mili, a mammalian member of piwi family gene, is essential for spermatogenesis [J]. *Development*, 2004, **131**(4): 839—849
- [7] Yano A, Guyomard R, Nicol B, *et al.* An immune-related gene evolved into the master sex-determining gene in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Current Biology CB*, 2012, **22**(15): 1423—1428
- [8] Hattori RS, Murai Y, Oura M, *et al.* A Y-linked anti-Mullerian hormone duplication takes over a critical role in sex determination [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, **109**(8): 2955—2959
- [9] Fan L N, Zhou L L, Li Y, *et al.* Expression of AR and ER genes in the testicular tissue of chickens, quails and chicken quail hybrids and its effects on the growth and development of testis [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2012, **32**(9): 1362—1367 [范丽娜, 周玲玲, 李岩, 等. AR、ER基因在鸡、鹌鹑及其杂交种睾丸组织中的表达及其对睾丸生长发育的影响. 中国兽医学报, 2012, **32**(9): 1362—1367]
- [10] Raghuveer K, Senthilkumaran B, Sudhakumari C C, *et al.* Dimorphic expression of various transcription factor and steroidogenic enzyme genes during gonadal ontogeny in the air-breathing catfish, *Clarias gariepinus* [J]. *Sex Development*, 2011, **5**(4): 213—223
- [11] Fu M, Chen Y B, Li J, *et al.* *Nobox* gene expression in Maiwa Yak Oocytes, early embryogenesis and fetal ovaries [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2014, **45**(11): 1746—1751 [符梅, 陈亚冰, 李键, 等. *Nobox*基因在麦洼牦牛卵母细胞、早期胚胎及胎儿卵巢的表达. 畜牧兽医学报, 2014, **45**(11): 1746—1751]
- [12] Xie Y, Nie C C, Cao Z W. Expression of mouse *ZP2* mRNA in the granulosa cells of follicles [J]. *Journal of Jinan University (Medicine Edition)*, 2010, **2**(31): 116—119 [谢妍, 乜春城, 曹佐武. 小鼠*ZP2* mRNA在卵泡颗粒细胞层的表达. 暨南大学学报(医学版), 2010, **2**(31): 116—119]
- [13] Heule C, Gppert C, Salzburge W, *et al.* Genetics and timing of sex determination in the East African cichlid fish *Astatotilapia burtoni* [J]. *BMC Genetics*, 2014, **15**(140): 1471—2156
- [14] Hornung U, Herpin A, Scharlt M. Expression of the male determining gene *dmrt1bY* and its autosomal coorthologue *dmrt1a* in medaka [J]. *Sexual Development Genetics Molecular Biology Evolution Endocrinology Embryology & Pathology of Sex Determination & Differentiation*, 2007, **1**(3): 197—206
- [15] Wang L, Hu T, Mi M D, *et al.* The effects of estrogen on gonadal differentiation and expressions of *DMRT1* and *SOX9* in *Pelodiscus sinensis* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, **38**(3): 467—473 [王莉, 胡涛, 宓猛冬, 等. 雌激素对中华鳖性腺分化及*DMRT1*、*SOX9*基因表达的影响. 水生生物学报, 2014, **38**(3): 467—473]
- [16] Ijiri S, Kaneko H, Kobayashi T, *et al.* Sexual dimorphic expression of genes in gonads during early differentiation of a teleost fish, the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* [J]. *Biology of Reproduction*, 2008, **78**(2): 333—341
- [17] Herpin A, Scharlt M. *Dmrt1* genes at the crossroads: a widespread and central class of sexual development factors in fish [J]. *FEBS Journal*, 2011, **278**(7): 1010—1019
- [18] Wu P, Gao Q, Liu D L, *et al.* Molecular identification of tyrosine kinase 2 (TYK2) gene from common carp *Cyprinus carpio* and its expression pattern [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, **39**(1): 229—233 [吴平, 高谦, 刘德立, 等. 鲤TYK2基因的克隆鉴定及组织表达分析. 水生生物学报, 2015, **39**(1): 229—233]
- [19] Du Q Y, Chang Z J, Wang F Y, *et al.* The cloning and expression analysis of *sox9b* in *Cyprinus carpio* [J]. *Acta Biologiae Experimentalis Sinica*, 2005, **38**(5): 397—403 [杜启艳, 常重杰, 王凤羽, 等. 鲤鱼中*Sox9b*基因的克隆和表达. 实验生物学报, 2005, **5**(38): 397—403]
- [20] Chen Y, Wang Y L, Tian J, *et al.* Expression analysis of genes which related to sex determination of zebrafish [J]. *Journal of Hydroecology*, 2010, **5**(3): 10—16 [陈芸, 王艺磊, 田佳, 等. 斑马鱼性别决定相关基因的表达分析. 水生态学杂志, 2010, **5**(3): 10—16]
- [21] Poonlaphdech S, Pepey E, Canonne M, *et al.* Temperature induced-masculinisation in the Nile tilapia causes rapid up-regulation of both *dmrt1* and *amh* expressions

- [J]. *General Comparative Endocrinology*, 2013, **193**(4): 234—242
- [22] Poonlaphdecha S, Pepey E, Huang S H, *et al.* Elevated *amh* gene expression in the brain of male tilapia (*Oreochromis niloticus*) during testis differentiation [J]. *Sex Development*, 2011, **5**(1): 33—47
- [23] Uchida D, Yamashita M, Kitano T, *et al.* Oocyte apoptosis during the transition from ovary-like tissue to testis during sex differentiation of juvenile zebrafish [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2002, **205**(6): 711—718
- [24] Baroiller J F, D'Cotta H, Bezault E, *et al.* Tilapia sex determination: Where temperature and genetics meet [J]. *Comparative Biochemistry & Physiology Part A Molecular & Integrative Physiology*, 2009, **153**(1): 30—38
- [25] Lu C, Su L N, Zhu B K, *et al.* Advances on the genes related with sex determination and differentiation of fish [J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2014, **13**(53): 2981—2986 [路畅, 苏利娜, 朱邦科, 等. 鱼类性别决定及分化相关基因研究进展湖北农业科学. 湖北农业科学, 2014, **13**(53): 2981—2986]
- [26] Matsuda M, Nagahama Y, Shinomiya A, *et al.* DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish [J]. *Nature*, 2002, **417**(6888): 559—563
- [27] Deng S P, Wang J J, Wu T L, *et al.* cDNA cloning and expression analysis of *Dmrt1* in *Clarias fuscus* [J]. *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]
- [28] Tang Y K, Li J L, Yu J H. Characterization and expression pattern of *Oreochromis aureus* anti-Müllerian hormone (*AMH*) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2009, **3**(33): 380—388 [唐永凯, 李建林, 俞菊华. 奥利亚罗非鱼 *AMH* 基因结构及其表达. 水产学报, 2009, **3**(33): 380—388]
- [29] A Herpin, M C Adolphi, B Nicol, *et al.* Divergent expression regulation of gonad development genes in medaka shows incomplete conservation of the downstream regulatory network of vertebrate sex determination [J]. *Molecular Biology & Evolution*, 2013, **30**(10): 2328—2346

TIMING OF SEX DETERMINATION AND EXPRESSION ANALYSIS OF GENES IN YELLOW RIVER CARP (*CYPRINUS CARPIO* VAR.)

JIA Yong-Fang, ZHANG Wan-Wan, ZHANG Rui-Hua, LIANG Ting-Ting, DU Qi-Yan and CHANG Zhong-Jie
(College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: The mechanisms of fish sex determination and differentiation are complex. The current study investigated the morphology and the expression of genes related to sex determination differentiation during development of Yellow River carp. Tissue sections of gonad of Yellow River carp indicated that the time of gonad derived from undifferentiated to stage II of testis or ovary were from 40 to 80 dpf (days post-fertilization). The results showed that sex determination related genes (*amh*, *ar*, *cyp19a*, *cyp19b*, *dax1*, *dmrt1*, *er*, *foxl2*, *nobox*, *sox9a*, *sox9b* and *zp2*) highly expressed at 50d, especially at 45—50 dpf. The expression of *ar*, *amh*, *dax1*, *dmrt1*, *sox9a*, *sox9b* increased at 80 dpf in males, which were significantly higher than those in females, suggesting that these genes might mediate male sexual differentiation. The expression of *cyp19a*, *cyp19b*, *foxl2*, *nobox*, *zp2* increased at 80d in females, which were higher than those in males, suggesting that they might regulate female sex differentiation.

Key words: Sex determination; Sex differentiation; Yellow River carp