

利用鱼类性别控制技术创制YY超雄和XY全雄乌苏里拟

蒋有渤 孙瑞东 谢焱 程宜 陈见 李佩 王忠卫 熊阳 梅洁

PRODUCTION OF YY SUPER-MALE AND XY ALL-MALE *PSEUDOBAGRUS USSURIENSIS* BY SEX CONTROL TECHNOLOGY

JIANG You-Bo, SUN Rui-Dong, XIE Yan, CHENG Yi, CHEN Jian, LI Pei, WANG Zhong-Wei, XIONG Yang, MEI Jie

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7541/2025.2024.0407>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

基于耳石微化学的乌苏里白鲑生境履历分析

MICROCHEMISTRY ANALYSIS OF OTOLITHS OF *COREGONUS USSURIENSIS* FROM THE HEILONG RIVER BASIN
水生生物学报. 2019, 43(4): 825–831 <https://doi.org/10.7541/2019.097>

哲罗鲑性别特异性标记筛选

CHARACTERIZATION OF SEX-SPECIFIC MARKER IN *HUCHO TAIMEN* (PALLAS)
水生生物学报. 2021, 45(4): 728–733 <https://doi.org/10.7541/2021.2020.084>

17 β -雌二醇诱导斑点叉尾雌性化研究

FEMINIZATION OF CHANNEL CATFISH INDUCED BY 17 β -ESTRADIOL
水生生物学报. 2022, 46(11): 1668–1674 <https://doi.org/10.7541/2022.2021.0254>

高温和皮质醇对黄颡鱼性别分化的影响

EFFECTS OF HIGH TEMPERATURE AND CORTISOL ON SEX DIFFERENTIATION OF YELLOW CATFISH (*TACHYSURUS FULVIDRACO*)
水生生物学报. 2021, 45(1): 106–117 <https://doi.org/10.7541/2021.2020.044>

温度对池蝶蚌雌雄同体和性逆转的影响

TEMPERATURE ON HERMAPHRODITISM AND SEX REVERSAL IN FRESHWATER PEAL MUSSEL, *HYRIOPSIS SCHLEGELII*
水生生物学报. 2022, 46(5): 741–753 <https://doi.org/10.7541/2021.2021.058>

金钱鱼下丘脑转录组分析及其对雌激素在体注射的响应

TRANSCRIPTOME ANALYSIS OF HYPOTHALAMUS IN MALE AND FEMALE SPOTTED SCAT (*SCATOPHAGUS ARGUS*) AND DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION IN 17 β -ESTRADIOL INJECTED MALES
水生生物学报. 2023, 47(8): 1195–1210 <https://doi.org/10.7541/2023.2022.0286>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

doi: 10.7541/2025.2024.0407

CSTR: 32229.14.SSSWXB.2024.0407

利用鱼类性别控制技术创制YY超雄和XY全雄乌苏里拟鲮

蒋有渤¹ 孙瑞东¹ 谢焱¹ 程宜¹ 陈见² 李佩²
王忠卫³ 熊阳^{1*} 梅洁^{1,3*}

(1. 华中农业大学水产学院, 湖北洪山实验室, 武汉 430070; 2. 武汉市农业科学院水产研究所, 武汉 430270; 3. 中国科学院水生生物研究所水产品种创制与高效养殖全国重点实验室, 武汉 430072; 4. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 研究探索了17 β -雌二醇(17 β -estradiol, E₂)的不同处理浓度和不同处理时间对乌苏里拟鲮(*Pseudobagrus ussuriensis*)生长、存活率和性比的影响。结果显示, 在10—70dph期间, 使用10、50和100 mg/kg E₂投喂乌苏里拟鲮的雌性率高达100%, 但生长速度和存活率随E₂浓度升高而降低, 投喂150 mg/kg E₂组乌苏里拟鲮全部死亡。利用10 mg/kg E₂投喂诱导乌苏里拟鲮100%雌性化的最佳时间为10—40dph。qRT-PCR结果显示雄性性别分化关键基因 $dmrt1$ 、 amh 和 $cyp17a1$ 在XY生理雌性的表达量显著低于XY雄性, 雌性性别分化关键基因 $cyp19a1a$ 、 $zar1$ 和 $gdf9$ 在XY生理雌性的表达量与XX雌性一致, 显著高于XY雄性。此外, 利用全基因组重测序技术在15尾雌性和15尾雄性乌苏里拟鲮中共筛选到3777645个SNP和1287509个Indel, 其中有99601个性别连锁SNP和27614个性别连锁Indel。性别连锁的SNP主要集中在乌苏里拟鲮8号染色体6.84—23.82 Mb的位置。利用性别连锁的Indel开发了乌苏里拟鲮X和Y染色体特异的分子标记, 适用于黑龙江野生群体、河南和湖北的养殖群体。使用性别分子标记在XY雄性与XY雌性繁殖的子一代中鉴定出了YY超雄鱼, 使用YY超雄鱼为父本繁殖的乌苏里拟鲮雄性率为100%, 1年龄个体的体重是两性养殖群体的1.54倍。综上所述, 在10—40dph期间使用10 mg/kg E₂诱导乌苏里拟鲮雌性化的效果最佳, 利用全基因组重测序技术开发的性别连锁分子标记能有效鉴定乌苏里拟鲮的遗传性别获得YY超雄鱼。研究创制的XY全雄乌苏里拟鲮与两性群体相比, 具有规格整齐和生长速度快的特点。

关键词: 性别连锁分子标记; 17 β -雌二醇; 性逆转; 乌苏里拟鲮

中图分类号: S965.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2025)05-052507-13



两性大小异形(Sexual Size Dimorphism, SSD)在鱼类中普遍存在, 例如大多数鲮科鱼类的雄性生长速度显著快于雌性, 而大多数鲤科鱼类的雌性生长速度显著快于雄性^[1]。我国科研工作者利用鱼类性别控制技术创制了一些生长速度快的单性养殖鱼类, 例如近4年经国家水产原种和良种审定委员会审定的新品种罗非鱼“粤闽1号”、翘嘴鲮“全雌1号”、全雌翘嘴鲮“鼎鲮1号”、翘嘴鲮“武农1号”、虹鳟“全雌1号”、黄颡鱼“全雄2号”和黄姑鱼“全雌1号”等。乌苏里拟鲮(*Pseudobagrus ussuriensis*)隶

属于鲮形目, 鲮科, 拟鲮属, 体型细长似牛尾又常被称为牛尾巴, 因其肉质细嫩, 无肌间刺, 味道鲜美, 粗脂肪含量高等特点, 深受广大消费者的喜爱^[2]。在相同养殖环境下, 二龄雄性乌苏里拟鲮的生长速度是雌性个体的3.09倍^[3]。因此, 利用鱼类性别控制技术创制生长速度快、经济价值高的全雄乌苏里拟鲮具有重要的生产意义, 而化学药物诱导性逆转和性别连锁分子标记开发是创制全雄鱼的关键步骤。

化学药物诱导鱼类性逆转的效果, 与鱼类遗传

收稿日期: 2024-09-20; 修订日期: 2024-12-06

基金项目: 湖北省杰青项目——长江特色鱼类精准性控育种的遗传学基础(2021CFA057)资助 [Supported by Excellent Youth Foundation of Hubei Provincial Natural Science Foundation (2021CFA057)]

作者简介: 蒋有渤(2000—), 男, 硕士研究生; 主要从事鱼类遗传育种研究。E-mail: jiangyb@webmail.hzau.edu.cn

通信作者: 熊阳(1993—), 男, 博士; 主要从事鱼类遗传育种研究。E-mail: xiongyang2018@163.com 梅洁(1981—), 博士, 教授; 主要从事鱼类遗传育种研究。E-mail: jmei@ihb.ac.cn *共同通信作者

背景、药物种类、处理方式、药物浓度和处理周期密不可分^[4]。携带 mal -品系的虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)响应高温易发生性逆转^[5]。经历性逆转的鱼类会通过表观遗传的改变遗传给子代,使其对环境因子更敏感易发生性逆转^[6]。诸多化学药物能够诱导鱼类性逆转,其中诱导鱼类雌性化的药物有17 β -雌二醇(17 β -estradiol, E_2)^[7]、乙炔基雌二醇(Ethinylestradiol, EE_2)^[8]和戊酸雌二醇(Estradiol valerate, EV)^[9]等。 E_2 是生物体内最具代表的天然雌激素之一,使用最为频繁。药物诱导鱼类雌性化的处理方式包括浸泡法、埋植法和投喂法。浸泡法所需要的激素量大,污染环境,而埋植法处理存在机械损伤,且二者诱导雌性化的效果均不如投喂法^[10]。绝大多数鱼类诱导雌性化是通过 E_2 投喂,而投喂 E_2 的浓度和周期均会影响处理鱼的生长速度、存活率和雌性化效率^[11]。因此,探索目标鱼类 E_2 处理的最佳浓度和投喂时间具有重要的指导意义。

经雌激素诱导获得的XY生理雌鱼与正常XX雌鱼无法用肉眼进行辨别,需借助性连锁分子标记进行遗传鉴定。开发性连锁分子标记主要针对鱼类性别差异基因及其连锁位点的差异来设计引物对,常见方法包括单核苷酸多态性(Single Nucleotide Polymorphism, SNP)、插入缺失标记(Insertion/Deletion, Indel)、微卫星标记(Simple Sequence Repeats, SSR)、随机扩增多态性DNA标记(Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD)和扩增片段长度多态性(Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP)^[12,13]。随着测序技术的发展和成本降低,研究人员逐渐采用通过高通量测序进行全基因组扫描的方式寻找鱼类性别特异分子标记,目前在丝尾鲮(*Mystus wyckioides*)^[14]、鳊(*Siniperca chuatsi*)^[15]、斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)^[16]等经济鱼类中获得了性别特异分子标记。

本文以乌苏里拟鲮为研究对象,探索 E_2 的不同处理浓度和不同处理时间对乌苏里拟鲮生长性能、存活率和性比的影响,并利用qRT-PCR检测性别分化关键基因在性腺的表达水平,评估雌性化的效果。利用全基因组重测序技术开发乌苏里拟鲮性别连锁分子标记,筛选XY生理雌鱼和YY超雄鱼。对乌苏里拟鲮全雄群体和两性群体进行性比和生长性能评估。

1 材料与方法

1.1 实验鱼来源

乌苏里拟鲮亲本[♀: (77.28±8.73) g, ♂: (154.47±17.62) g]饲养在武汉市水产科学研究所实验基地,

人工繁殖参考黄颡鱼稍做修改^[17],第一针: 10 μ g/kg LHRH- A_2 ; 第二针: 10 μ g/kg LHRH- A_2 + 1500 IU/kg HCG, 两针间隔12h, 人工授精后用网片进行孵化。本研究获得了华中农业大学实验动物管理和使用伦理委员会批准(HZAUF1-2020-0033), 实验过程中操作人员严格遵守伦理规范, 并按照华中农业大学伦理委员会制定的规章制度执行。

1.2 雌二醇诱导雌性化

饲料制备 将10、50、100和150 mg的 E_2 (Selleck, 美国)分别溶于400 mL 95%乙醇溶液中, 用喷壶均匀喷洒在1 kg饲料上, 利用太阳自然晒干后放于通风干燥的地方保存。对照组的饲料仅喷洒相同体积的95%乙醇溶液, 晒干后备用。

不同浓度 E_2 处理实验设计 设置了对照组, 10、50、100和150 mg/kg的 E_2 处理组, 共5个组。每个组设置3个平行缸(0.60 m×0.50 m×0.35 m), 每个缸中随机放入80尾鱼苗。乌苏里拟鲮苗在孵化后4dph(days-post hatching)用丰年虫开口, 在7dph使用山东升索微颗粒配合饲料S2进行驯化, 先投喂饲料, 再补充丰年虫, 直至9dph完全投喂饲料。在10—70dph各组投喂对应浓度的 E_2 饲料, 71—90dph投喂不含激素的常规饲料, 在此期间水温控制在26—28℃, 溶解氧5.9—7.5 mg/L, pH 7.8—8.0。饲料大小根据鱼苗适口性统一更换。每天7:30和18:30分别进行饱食投喂, 0.5h后将剩余饲料和粪便吸出并更换2/3的水量。

不同时间 E_2 处理实验设计 设置了对照组和5个时间处理组, 包括10—20、10—30、10—40、10—50和10—60dph。对照组投喂不含激素的饲料, 各时间处理组在处理期间投喂10 mg/kg的 E_2 饲料, 其余时间投喂正常饲料。养殖环境、放养密度、投喂方式等均与上述保持一致。

1.3 生长、存活率和性比统计

在90dph统计各组乌苏里拟鲮的存活率, 每个平行缸随机挑选30尾乌苏里拟鲮用于体长和体重测量(共90尾), 若不足30尾则全部用于测量。同时, 将测量后个体用于性比统计分析。具体步骤: 使用100 mg/kg 3-氨基苯甲酸乙酯甲基磺酸盐(MS-222)将乌苏里拟鲮麻醉后, 剪鳃放血, 剪刀从肛门开始沿着两侧的侧线剪至胸鳍基部, 移除肝脏、肠和胃等器官。在后肾位置滴加少许波恩氏液(Bouin's)即可观察性腺, 置于解剖镜下, 将电荷耦合器件(CCD)相机连接电脑后拍照保存, 并剪取少许尾鳍与性腺照片一一对应, 保存在无水乙醇中用于DNA提取。将性腺保存在PFA固定液中, 放入4℃冰箱过夜固定, 经过基因型鉴定后, 各随机挑选5个XY

基因型的精巢、XY基因型的卵巢和XX基因型的卵巢, 进行石蜡包埋、切片、脱水、透明和脱蜡等步骤, 利用苏木素染色细胞核及伊红染色细胞质(HE staining), 脱水后封片进行显微镜观察并采集性腺组织图像。

1.4 全基因组重测序与质控

参考上述方法确定乌苏里拟鲮表型性别, 将乌苏里拟鲮分为雌鱼和雄鱼2组, 每组各取15尾鱼的尾鳍用苯酚-氯仿法提取全基因组DNA。NanoDrop 2000分光光度计(NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA)和琼脂糖凝胶电泳检测基因组DNA质量。每尾个体单独进行全基因组重测序文库构建和测序, 步骤: 利用机械打断的方法(超声波)将DNA片段化, 然后进行片段纯化、末端修复、3'端加A、连接测序接头, PCR扩增形成测序文库, 进行文库质检, 质检合格的文库通过Illumina HiSeq PE150测序平台进行测序。测序结果通过Fastp v0.23.2 (<https://github.com/OpenGene/fastp>)过滤得到clean reads。

1.5 性别连锁SNP和Indel分析

通过BWA v0.7.17 (<https://github.com/lh3/bwa>)软件基于MEN算法比对到乌苏里拟鲮雌鱼(XX)的参考基因组, 通过SAMtools v1.16.1 (<https://github.com/samtools/samtools>)对样本与参考基因组之间的比对率和覆盖深度等进行统计。使用GATK v4.6.0.0 (<https://github.com/broadinstitute/gatk>)的Haplotype Caller进行varinats calling得到gVCF文件, 使用Glnexus v1.4.1 (<https://github.com/dnanexus-rnd/GLnexus>)合并gVCF文件; 用Bcftools v1.16 (<http://github.com/samtools/bcftools>)对SNP和Indel进行过滤和筛选。最后使用SNP-Indel算法进行标记与性别之间的关联分析, 筛选性别连锁SNP和Indel。

1.6 性别特异分子标记引物的开发及验证

在性别连锁的Indel序列区域使用primer 5.0软件批量设计引物, 选取70对引物送往武汉擎科生物科技有限公司合成。随机选取乌苏里拟鲮雄鱼和雌鱼各4尾, 对70对引物进行初筛, 挑选出两对符合要求且较易扩增的引物命名为M1和M2, 对乌苏里拟鲮48尾性成熟个体(河南省和湖北省养殖群体及黑龙江野生群体的乌苏里拟鲮雌、雄鱼各8尾)进行大样本扩增验证。PCR扩增体系(10.0 μ L): 2 $\times$ PCR Mix Buffer 5.0 μ L、上下游引物各0.5 μ L、DNA模板1.0 μ L、ddH₂O 3.0 μ L。M1的PCR反应程序为94 $^{\circ}$ C 预变性3min, 34个循环(94 $^{\circ}$ C 30s、54 $^{\circ}$ C 30s、72 $^{\circ}$ C 24s), 72 $^{\circ}$ C 5min。M2的PCR反应程序退火温度为51 $^{\circ}$ C, 延伸时间为19s, 其他程序同引物M1, 通

过琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物。利用引物筛选乌苏里拟鲮雌性化的XY生理雌鱼, 与普通XY雄鱼进行人工繁殖, 并从其子代中筛选出YY超雄鱼。

1.7 qRT-PCR检测性别分化关键基因在性腺的表达水平

利用TRIzol试剂(TaKaRa, 日本)提取90dph对照组的乌苏里拟鲮XY雄性精巢、XX雌性卵巢及10—40dph组的乌苏里拟鲮XY雌性卵巢的总RNA。利用NanoDrop 2000 分光光度计检测RNA浓度和纯度, 使用1%琼脂糖凝胶电泳检测RNA完整性。检测合格的RNA使用PrimeScriptTM RT reagent Kit (TaKaRa, 日本)合成cDNA, 稀释5倍后备用。根据XX雌性乌苏里拟鲮基因组信息分别设计了雄性性别分化关键基因 $dmrt1$ 、 amh 和 $cyp17a1$ 引物, 雌性性别分化关键基因 $cyp19a1a$ 、 $zar1$ 和 $gdf9$ 引物, 以 β -actin基因作为内参基因, 引物名称、序列等信息如表1所示。qRT-PCR反应体系: SYBR Green染料(TaKaRa, 日本) 10 μ L、上下游引物各1 μ L、cDNA模板2 μ L、ddH₂O 6 μ L。qRT-PCR反应程序: 95 $^{\circ}$ C

表1 乌苏里拟鲮基因型鉴定引物和定量PCR引物

Tab. 1 Primer of genotype identification and qRT-PCR in *P. ussuriensis*

引物名称 Primer name	引物序列 Sequence (5'—3')	扩增大小 Amplicon size (bp)	目的 Purpose
M1-F	TCCCTCCAAGATTACG	Y和X特异 片段分别为 349和 424 bp	基因型鉴定
M1-R	CTCGCAGGCAGACAG AA		
M2-F	ACCATCTGCTGAAACC	Y和X特异 片段分别为 212和 308 bp	基因型鉴定
M2-R	CAGGACCAAATCAAA TAAG		
$dmrt1$ -F	AACCACGGCTTCGTCT CG	217	qRT-PCR
$dmrt1$ -R	CAGGCTCATTCTTCAC CACA		
amh -F	TTGCTTCTGCCACTAA CG	285	qRT-PCR
amh -R	TTCGGCTCACCGTCCT TA		
$cyp17a1$ -F	GAGTTGAGCCTTACAC CC	269	qRT-PCR
$cyp17a1$ -R	CAGACTGGTCCTGTCA CTTA		
$zar1$ -F	TGTGAAGGAAGGACC GAAGA	281	qRT-PCR
$zar1$ -R	CTCCCAGCGAAGGTTG CA		
$cyp19a1a$ -F	AACATCACGCTGTGGA AG	199	qRT-PCR
$cyp19a1a$ -R	GAACAGACGGTTGGA AAT		
$gdf9$ -F	TAGACCCGATTCCAGA TA	255	qRT-PCR
$gdf9$ -R	AAGTGATACCGCGTA GTT		
β -actin-F	ATTGCCGCACTGGTTG TT	270	qRT-PCR
β -actin-R	CAGCTCGTTGTAGAAG GTATGA		

预变性5min, 40个循环(95℃ 15s、58℃ 30s、72℃ 15s)。进行3次生物学重复, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值法计算基因在样本中的相对表达量。

1.8 乌苏里拟鲿全雄群体与两性群体生长对比试验

分别以乌苏里拟鲿性别连锁分子标记筛选的YY超雄鱼和XY雄鱼为父本, 进行人工繁殖获得乌苏里拟鲿全雄群体与两性群体的水花。水花的养殖环境、开口和驯料步骤同1.2所述。全雄群体与两性群体各设置3个平行缸, 每缸养殖100尾。在90dph转移至直径1.5 m×水深1 m的圆桶中进行循环水养殖至1年龄。在1年龄, 每缸随机选择30尾测量体长和体重, 并参考1.3所述的方法统计全雄群体与两性群体性比。

1.9 数据分析

使用Excel 2010和SPSS 19.0软件对所有原始数据进行分析, 所得的实验数据以平均值±标准差(SD)呈现。采用单因素方差分析(One-way ANOVA)检验 E_2 不同浓度和不同时间处理乌苏里拟鲿的体长、体重、存活率和性比。表格中相同的字母上标表示无显著性差异, 不同的字母上标表示存在显著性差异。

2 结果

2.1 全基因组重测序数据分析

15个雄性样本和15个雌性样本的测序参数统计如表 2所示, 共获得430.33 Gb的clean reads, 平均

表 2 全基因组重测序数据统计及与参考基因组比对分析

Tab. 2 Statistics on genome re-sequencing data and results of mapping to reference genome of *P. ussuriensis*

样品名 Sample	测序数据 Clean reads (Gb)	Q20 (%)	GC (%)	比对片段 Mapped reads	比对率 Mapping rate (%)	测序深度 Depth (×)	覆盖率 Coverage (%)
雌1	14.50	98.15	39.23	96749092	98.48	19.81	95.94
雌2	11.57	98.19	39.17	76718966	98.31	15.86	95.79
雌3	13.86	98.32	39.35	91846572	98.33	18.88	95.96
雌4	13.14	98.40	39.24	87469694	98.50	17.98	95.94
雌5	14.29	98.35	39.39	94780100	98.38	19.45	96.12
雌6	16.50	98.45	39.56	111238674	98.66	22.43	96.23
雌7	14.22	98.28	39.21	94303612	98.40	19.48	95.75
雌8	14.99	98.25	39.40	99265184	98.36	20.40	96.26
雌9	16.40	97.89	39.27	109939318	98.61	22.32	96.11
雌10	15.48	98.26	39.32	103286516	98.45	21.15	96.09
雌11	14.51	98.16	39.40	96758464	98.45	19.77	96.24
雌12	15.55	97.89	39.34	103774566	98.53	21.19	96.02
雌13	13.80	98.18	39.29	92052298	98.46	18.93	95.76
雌14	16.34	98.51	39.88	111871132	98.73	22.25	96.22
雌15	15.31	97.82	39.24	102373812	98.58	20.89	96.10
雄1	14.72	97.90	39.25	98008536	98.33	20.11	96.04
雄2	12.86	97.53	39.33	85642362	98.40	17.70	95.63
雄3	14.50	98.08	39.44	96807852	98.34	19.78	96.03
雄4	16.03	98.41	39.19	107289926	98.58	21.89	95.98
雄5	14.39	98.20	39.31	95864434	98.41	19.67	95.98
雄6	16.13	97.51	39.31	107485372	98.49	22.09	95.77
雄7	13.37	98.25	39.41	88689152	98.38	18.26	95.98
雄8	15.14	97.99	39.26	100476860	98.33	20.70	95.96
雄9	14.72	98.16	39.28	98048248	98.33	20.07	96.11
雄10	11.52	94.47	39.17	77728982	98.80	15.95	95.15
雄11	14.58	97.58	39.18	97830558	98.53	19.95	95.85
雄12	15.19	98.31	39.27	101311888	98.44	20.75	96.13
雄13	13.13	98.15	39.27	87638776	98.42	17.98	95.87
雄14	14.43	97.97	39.40	96155192	98.37	19.68	96.04
雄15	9.16	94.62	39.50	61381790	98.60	12.75	94.93
均值Average	14.34	97.87	39.33	95759597	98.47	19.60	95.93

每个样本14.34 Gb clean reads, 平均Q20值为97.87%, 平均GC含量为39.33%, 说明测序数据良好。与乌苏里拟鲮参考基因组进行比对, 平均比对reads数目为95759597, 平均比率为98.47%, 平均测序深度为19.60×, 平均覆盖率为95.93%。

2.2 性别特异性SNP和Indel统计分析

以XX雌性乌苏里拟鲮为参考基因组, 雌雄乌苏里拟鲮各15尾全基因组单独重测序获得的SNP和Indel统计结果如表3所示: 雌性乌苏里拟鲮的SNP总数为1682511—1758374个, 其中性别连锁SNP数目为14—761个, Indel总数为549668—579774个, 其中性别连锁Indel数目为9—194个。雄性乌苏里拟

鲮的SNP总数为1589405—1900439, 其中性别连锁SNP数目为94634—99323个, Indel总数为485372—612275个, 其中性别连锁Indel数目为25674—27494个。过滤后SNP总数为3777645个, 其中性别连锁SNP总数为99601个。过滤后Indel总数为1287509个, 其中性别连锁Indel总数为27614个。SNP主要在4号和8号染色体上分布(图1A), 其中性别连锁SNP主要分布在8号染色体(图1B和1C), 集中在8号染色体6.84—23.82 Mb位置(图1D), 表明8号染色体可能是乌苏里拟鲮的性染色体。

2.3 性别特异性分子标记开发与验证

调取参考基因组8号染色体6.84—23.82 Mb序列信息, 基于重测序数据获得的Indel位置信息设计性别连锁分子标记并进行引物验证, 挑选出两对符合要求且较易扩增的引物命名为M1和M2。将M1和M2在黑龙江野生群体、河南和湖北养殖群体的乌苏里拟鲮进行扩大样本验证, 使用引物M1验证雌性个体时仅能扩增出424 bp一条带, 而雄性个体扩增出424和349 bp两条带(图2A), 使用引物M2验证雌性个体时仅能扩增出308 bp一条带, 而雄性个体扩增出212和308 bp两条带(图2B)。将扩增产物进行切胶回收, 再利用Sanger法进行测序。雌性测序结果与XX参考基因组保持一致, 从而证明参考基因组组装的准确性。雄性片段测序结果与重测序的Indel保持一致, 从而证明了重测序的测序结果的可靠性(图3)。

2.4 不同浓度E₂处理对乌苏里拟鲮生长、存活率和性别分化的影响

在10—70dph期间, 投喂含有不同浓度E₂的饲料诱导乌苏里拟鲮雌性化。结果如表4所示: 对照组的乌苏里拟鲮体长和体重分别为(7.79±1.20) cm和(7.19±1.86) g, 而投喂不同浓度E₂组的乌苏里拟鲮体长和体重均显著低于对照组, 随着投喂E₂浓度的增加, 体长和体重逐渐降低; 乌苏里拟鲮的存活率随着投喂E₂浓度的增加而显著降低, 而投喂150 mg/kg E₂组的乌苏里拟鲮在养殖过程中全部死亡, 表现为肝脏肿大, 腹水等现象。在90dph对各组进行大量解剖、显微镜观察, 发现乌苏里拟鲮的精巢呈栉状分支, 性腺切片HE染色可观察到精原细胞、初级精母细胞和次级精母细胞(图版I)。对照组的卵巢可观察到大量初级卵母细胞, 细胞核可清晰观察到核仁。通过开发的乌苏里拟鲮性别连锁分子标记鉴定, 不同浓度E₂组XY个体的性腺均发育为卵巢, 其形态与正常XX雌性个体卵巢相似呈膨大的棒状, 观察到大量初级卵母细胞(图版I)。

表3 SNP和Indel统计分析
Tab. 3 Statistics on SNP and Indel

样品名 Sample	SNP总数 Number of SNP	性别连锁SNP Number of sex linkage SNP	Indel总数 Number of Indel	性别连锁Indel Number of sex linkage Indel
雌1	1740567	170	565254	56
雌2	1740223	761	557201	194
雌3	1687628	157	550540	68
雌4	1748462	62	568832	30
雌5	1717626	349	560197	97
雌6	1758374	45	579774	26
雌7	1687038	488	549668	140
雌8	1749949	92	579301	33
雌9	1756990	14	574583	9
雌10	1687241	156	553102	67
雌11	1682511	605	552340	130
雌12	1752807	40	571522	23
雌13	1746836	275	563831	74
雌14	1725321	159	552191	60
雌15	1739789	368	568588	108
雄1	1883954	99233	609847	27476
雄2	1773911	98768	566891	27317
雄3	1888591	99052	608598	27371
雄4	1891707	99323	612275	27494
雄5	1900439	99098	611746	27424
雄6	1894298	99310	610198	27484
雄7	1864146	98944	601139	27317
雄8	1808798	99250	584040	27478
雄9	1863312	99233	602056	27459
雄10	1673463	97382	519145	26630
雄11	1833216	99183	585992	27437
雄12	1830696	99236	595590	27471
雄13	1889415	98928	601542	27303
雄14	1815201	99130	585570	27457
雄15	1589405	94634	485372	25674
过滤后Filter	3777645	99601	1287509	27614

2.5 不同时间E₂处理对乌苏里拟鲮生长、存活率和性别分化的影响

上述研究表明10 mg/kg E₂能完全诱导乌苏里拟鲮雌性化, 且对其生长和存活率影响最小。进一步, 本研究探索10 mg/kg E₂不同时间处理对乌苏里拟鲮生长、存活率和性别分化的影响。结果如表5所示, 乌苏里拟鲮的体长和体重随着E₂投喂时间增加而减小, 仅投喂E₂ 10d的乌苏里拟鲮(10—20dph组)体长和体重分别为(7.30±0.80) cm和(6.46±1.23) g, 仍显著低于对照组($P<0.05$)。各E₂不同时间处理组的存活率与对照组无显著性差异($P>0.05$)。10—20dph和10—30dph组乌苏里拟鲮的卵巢比例分别为(64.44±5.09)%和(95.56±1.93)%, 而10—40、10—50和10—60dph组乌苏里拟鲮卵巢比例都为100%。E₂不同时间处理各组的卵巢比例均显著高于对照组(48.89±3.85)%。综上所述, 10 mg/kg E₂诱导乌苏里拟鲮雌性化最佳处理时间为10—40dph。

2.6 性别分化关键基因表达分析

通过qRT-PCR对90dph对照组的雄鱼、雌鱼的XY精巢和XX卵巢组织, 以及10 mg/kg E₂处理10—

40dph组的XY生理雌鱼的卵巢组织中雄性性别分化关键基因和雌性性别分化关键基因的表达量进行检测。结果显示: 雄性性别分化关键基因*dmrt1*、*amh*和*cyp17a1*在XY精巢中的表达量显著高于XY和XX卵巢($P<0.05$; 图4A—C), 而雌性性别分化关键基因*cyp19a1a*、*zar1*和*gdfr*在XY和XX卵巢组织中的表达量显著高于XY精巢组织($P<0.05$; 图4D—F), 上述基因在XY卵巢和XX卵巢的表达量均无显著性差异($P>0.05$; 图4)。

2.7 乌苏里拟鲮全雄群体与两性群体生长对比

利用引物M2筛选XY雄性与XY生理雌性繁殖获得的子代, YY超雄鱼仅有212 bp单条带(图5A), 在832条子代中鉴定出了212条YY超雄鱼, 占比约为25.48%。分别以YY超雄鱼为父本繁殖获得乌苏里拟鲮全雄群体, 以XY雄鱼为父本繁殖获得乌苏里拟鲮两性群体, 进行生长对比试验。乌苏里拟鲮全雄群体和两性群体的雄性率分别为(100.00±0.00)%和(52.22±6.94)% (图5B)。养殖至1年龄时乌苏里拟鲮全雄群体体重为(76.36±19.33) g, 是乌苏里拟鲮两性群体体重[(49.68±22.11) g]的1.54倍(图5C和5D)。

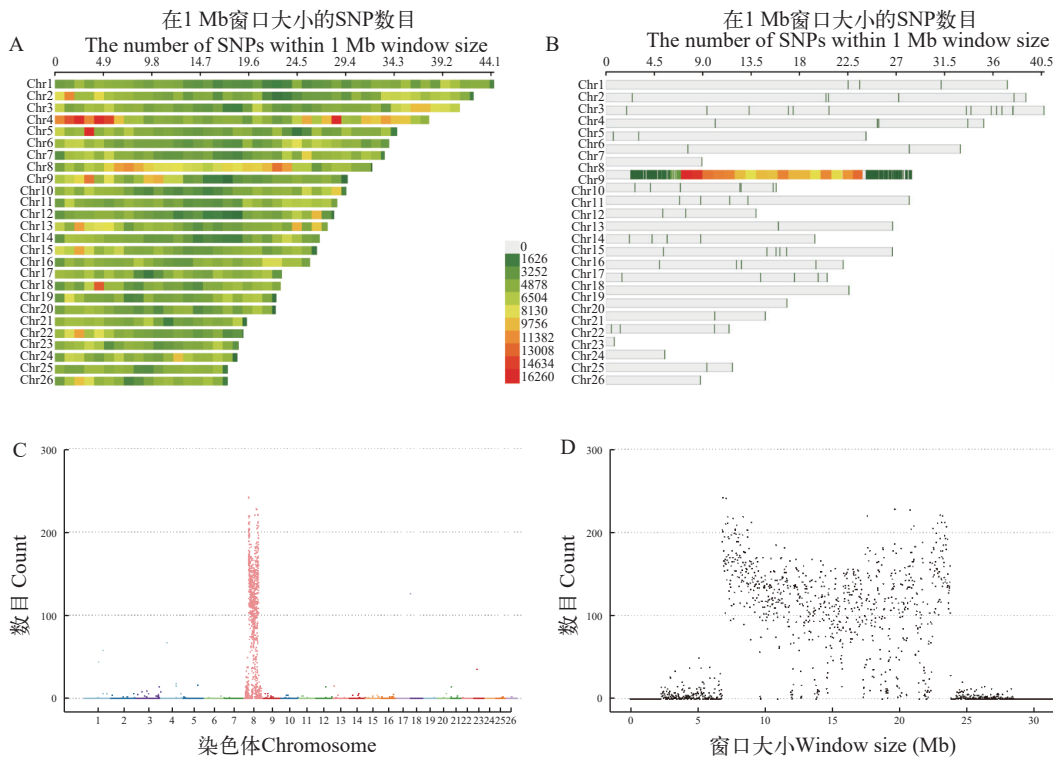


图1 染色体 SNP 分布情况

Fig. 1 Distribution of SNP in chromosome

A. 染色体SNP密度分布图; B. 染色体性别连锁SNP密度分布图; C. 性别连锁SNP在染色体上的分布; D. 性别连锁SNP在8号染色体上的分布

A. density profile of SNP in chromosome; B. density profile of sex linkage SNP in chromosome; C. distribution of sex linkage SNP in chromosome; D. distribution of sex linkage SNP in chromosome 8

3 讨论

3.1 鱼类通过E₂处理等方法诱导雌性化的研究

脊椎动物性别决定多样性与性染色体的演化密切相关, 鸟类和哺乳类等高等脊椎动物性染色体分化程度高, 其性别分化主要受性别决定基因控制, 而鱼类、两栖类和爬行类等低等脊椎动物性染色体分化程度低, 其性别分化易受温度、种群密度、光照和外源性激素等环境因子的影响^[18]。绝大多数鱼类具有两性异型, 利用外源性激素干扰鱼类早期性别分化过程是获得经济价值高的单性养殖群体的重要途径^[1]。E₂是诱导鱼类雌性化的天然诱导剂, 已在多种鱼类中开展雌性化的研究。

不同鱼类性别分化时间存在差异, 探索鱼类早期性腺分化关键节点对开展雌性化试验具有重要的指导性意义。研究发现乌苏里拟鲢受精后9dpf (Days post fertilization)形成生殖脊, 17dpf生殖细胞开始增殖, 25dpf形成卵巢腔, 36dpf形成输精管, 表明人工诱导乌苏里拟鲢性逆转需在17dpf之前进行^[3]。

本文采用不同浓度E₂对乌苏里拟鲢进行雌性化处理, 其诱导的起始时间为10dpf (约12dpf), 早于乌苏里拟鲢性腺分化起始。本研究发现10、50和100 mg/kg E₂处理的乌苏里拟鲢雌性化率高达100%, 但生长速率和存活率随E₂浓度的增加而降低。鲇形目鱼类较易被诱导雌性化, 甚至生长在天然水域的水蚯蚓(*Limnodrilus* spp.)能诱导黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)和南方鲇(*Silurus meridionalis*)雌性化^[19, 20]。斑点叉尾鲟投喂30 mg/kg E₂时的雌性化率为81.4%, 投喂60 mg/kg E₂时的雌性化率为100%^[7]。黄颡鱼投喂20 mg/kg E₂时的雌性比例为83.6%, 投喂50 mg/kg E₂的比例为100%^[10, 21]。瓦氏黄颡鱼(*P. vachelli*)投喂20和40 mg/kg E₂时的雌性比例均为100%^[22]。长吻鲢(*Leiocassis longirostris*)投喂10、50、100和150 mg/kg E₂时的雌性比例均为100%^[23]。这表明在部分鲇形目鱼类中10 mg/kg E₂处理可以诱导100%雌性化, 后续的研究可以在此基础上, 探索进一步降低E₂浓度对乌苏里拟鲢雌性化的影响。本研究发现10 mg/kg E₂诱导乌苏里拟鲢100%雌性化

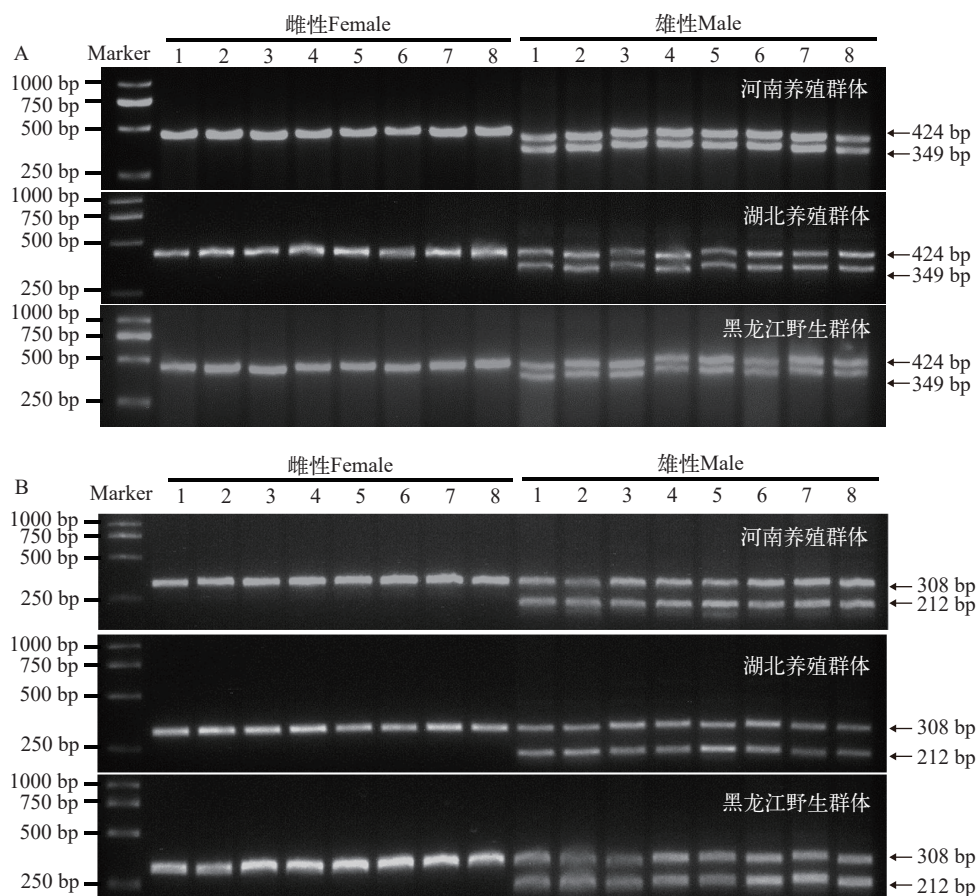


图2 性别特异性引物PCR验证图

Fig. 2 PCR validation picture of sex linkage primer

引物M1(A)和引物M2(B)在河南和湖北养殖群体及黑龙江野生群体乌苏里拟鲢中验证

Primer M1 (A) and M2 (B) validation in Henan and Hubei Province culture populations, and Heilongjiang River wild population

的有效处理时间为10—40dph, 且乌苏里拟鲮的体长和体重随着E₂投喂时间增加而减小。因为乌苏里拟鲮存在两性大小异形, 在不同时间E₂处理的过程中, 性比的改变也会影响其生长性能。此外, 本文单独计算出对照组雌鱼平均体长和体重为(7.54±1.01) cm和(7.11±1.67) g, 显著高于不同时间E₂处理组的体长和体重($P<0.05$)。10—40、10—50和10—60dph组的雌性比例均为100%, 并且10—40dph组的体长和体重显著高于其余两组($P<0.05$)。因此, 在不同时间E₂处理的过程中乌苏里拟鲮生长性能的降低主要是由E₂处理造成的。综上所述, 10 mg/kg E₂诱导乌苏里拟鲮100%雌性化的最佳处理时间为10—40dph。黄颡鱼投喂50 mg/kg E₂诱导100%雌性化的最佳处理时间为4—34dph^[21], 瓦氏黄颡鱼投喂20 mg/kg E₂诱导100%雌性化的有效时间为22—

40dph^[22], 而长吻鮠投喂10 mg/kg E₂诱导100%雌性化的有效时间为25—75dph^[23]。以上鲇形目鱼类的卵巢分化时间早于精巢, 卵巢腔的形成都在15—40dph期间, E₂处理时间覆盖卵巢腔形成的时间时诱导雌性化的效果较好。此外, 上述鲇形目鱼类的生长速率和存活率都随着投喂E₂浓度的增加而减小。研究表明E₂处理组鱼的补体基因显著降低, 在细菌感染实验中的存活率显著低于对照组^[24]。黄颡鱼投喂实验发现E₂投喂组与对照组在摄食量上无显著性差异, 但E₂投喂组的生长受到抑制, 这种生长差异是由肝脏能量分配差异导致的^[25]。

为了进一步确定10 mg/kg E₂处理10—40dph诱导乌苏里拟鲮雌性化的有效性, 本研究评估了性别分化关键基因在XY生理雌鱼与普通个体性腺组织的表达。*dmrt1*是一个经典的性别决定基因, 主要调控精巢分化相关下游基因^[26]。*amh*属于TGF-β家族, 在雄性生殖细胞增殖和分化方面发挥重要的作用^[27]。*cyp17a1*是合成17-羟基孕酮的关键酶, 而17-羟基孕酮是睾酮和雌二醇的前体^[28]。*cyp19a1a*是合成芳香化酶的关键基因, 而芳香化酶是将雄激素转换为雌激素的关键酶^[29]。*zar1*通过抑制母源mRNA的翻译对早期卵子发生至关重要^[30]。*gdf9*在斑马鱼(*Danio rerio*)中与雌性性别决定和配子生成相关^[28]。在长吻鮠^[23]和乌苏里拟鲮^[31]投喂E₂后, *dmrt1*、*amh*和*cyp17a1*等雄性分化关键基因在XY卵巢中显著下调, 而*cyp19a1a*、*zar1*和*gdf9*等雌性分化关键基因在XY卵巢中显著上调, 与本研究结果的表达趋势一致。进一步说明在乌苏里拟鲮性别分化期间投喂E₂能够抑制雄性分化关键基因的表达, 并促进雌性分化关键基因表达, 进而实现XY基因型乌苏里拟鲮由遗传型雄性向生理型雌性转换。

3.2 鱼类性别特异性分子标记开发

与哺乳动物和鸟类不同, 绝大多数鱼类的性染

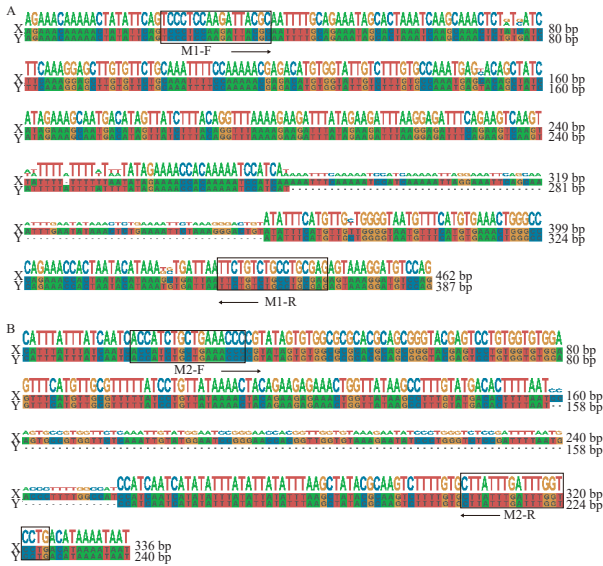


图3 性别特异性引物扩增条带序列

Fig. 3 Sequence of band amplified by sex linkage primer
引物M1 (A)和引物M2 (B)扩增产生的特异性条带序列
Sequence of band amplified by primer M1 (A) and M2 (B)

表4 不同浓度梯度E₂投喂条件下的90dph乌苏里拟鲮生长、存活率和性逆转比例统计

Tab. 4 Statistics on growth, survival rate, and sex reversal ratio of *P. ussuriensis* treated with different concentrations of E₂ at 90dph

雌二醇浓度 E ₂ concentration (mg/kg)	体长 Body length (cm)	体重 Body weight (g)	存活率 Survival rate (%)	卵巢比例 Ovarian ratio (%)	性逆转率 Sex reversal ratio (%)
对照组	7.79±1.20 ^a	7.19±1.86 ^a	90.00±2.50 ^a	54.45±3.85 ^b	0.00±0.00 ^b
10	6.48±0.93 ^b	4.43±1.06 ^b	89.08±3.26 ^a	100±0.00 ^a	100±0.00 ^a
50	5.81±0.96 ^c	3.62±0.99 ^c	41.42±3.50 ^b	100±0.00 ^a	100±0.00 ^a
100	5.13±0.74 ^d	3.07±0.63 ^d	21.17±2.50 ^c	100±0.00 ^a	100±0.00 ^a
150	—	—	—	—	—

注: 对不同浓度E₂的数据显著性差异用“a, b, c, d”表示, 同列数据不同字母上标表示有显著差异($P<0.05$), 卵巢比例(%)=(卵巢数量/解剖性腺总数量)×100, 性逆转率(%)=(XY卵巢数量/解剖XY性腺总数量)×100; 下同

Note: The significant differences in data for different concentrations of E₂ are represented in “a, b, c, d”. In the same line, different superscript letters indicate significant differences ($P<0.05$). Ovarian ratio (%)=(number of ovaries / total number of dissected gonads)×100, sex reversal ratio (%)=(number of XY ovaries/total number of dissected XY gonads)×100; the same applies below

染色体分化程度低, 仅存在SNP和Indel差异。因此, 在鱼类中开发性别特异性分子标记相当困难。在一些鱼类中利用AFLP、SSR和SNP等传统方法成功开发了性别特异性标记, 然而这些传统方法筛选引物过程繁琐, 且绝大多数标记序列相对较短, 有的标记仅适用于某一特定群体或家系^[12, 13]。基因组测序技术的飞速发展, 为DNA分子标记的开发提供了新途径。全基因组重测序通过对不同个体之间进行基因组测序, 与参考基因进行比较分析, 可以筛选出大量的SNP、Indel、结构变异和拷贝数

变异等信息^[32]。本研究利用重测序技术筛选了乌苏里拟鲮性别特异分子标记, 对15尾雄性和15尾雌性个体分别进行基因组重测序, 共筛选到3777645个SNP和1287509个Indel, 其中有99601个性别连锁SNP和27614个性别连锁Indel。在白斑狗鱼(*Esox lucius*)中通过混池重测序在雌性和雄性中分别获得了2076647和2076942个SNP位点, 以及105810和647466个Indel位点^[33]。在南方鲇中分别进行雌雄混池重测序获得2421301和2468613个SNP位点^[34]。与其他物种相比, 乌苏里拟鲮SNP位点和Indel位点

表 5 10 mg/kg E₂投喂不同时间组90dph乌苏里拟鲮生长、存活率和性逆转比例统计

Tab. 5 Statistics on growth, survival rate, and sex reversal ratio of *P. ussuriensis* treated with different sustained times of 10 mg/kg E₂ at 90dph

持续时间 Sustained time (dph)	体长 Body length (cm)	体重 Body weight (g)	存活率 Survival rate (%)	卵巢比例 Ovarian ratio (%)	性逆转率 Sex reversal ratio (%)
对照组	7.69±1.09 ^a	7.18±1.76 ^a	88.75±1.25 ^a	48.89±3.85 ^c	0.00±0.00 ^d
10—20	7.30±0.80 ^b	6.46±1.23 ^b	89.58±5.64 ^a	64.44±5.09 ^b	34.78±1.27 ^c
10—30	7.26±1.10 ^b	6.36±1.30 ^b	88.75±2.50 ^a	95.56±1.93 ^a	92.33±3.60 ^b
10—40	7.12±0.96 ^b	5.46±1.54 ^c	89.17±1.91 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a
10—50	6.44±0.75 ^c	4.55±1.13 ^d	88.75±5.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a
10—60	6.44±0.76 ^c	4.94±1.07 ^d	88.33±3.82 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a

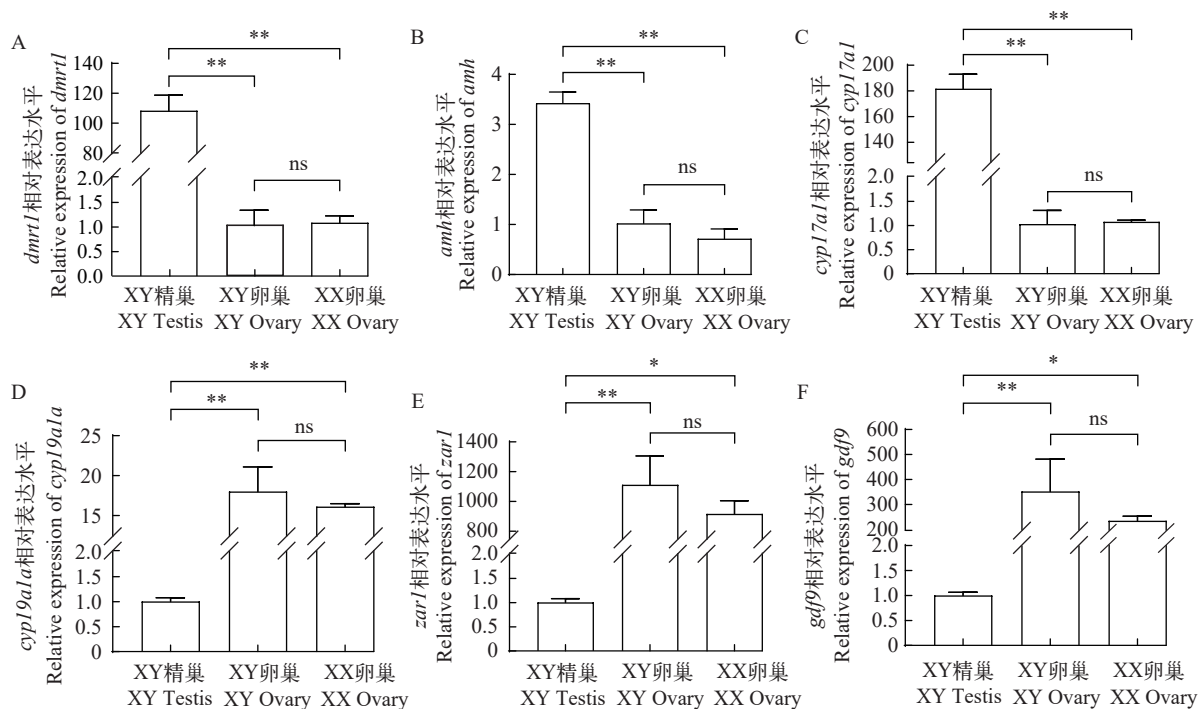


图 4 性别分化关键基因在性腺的表达分析

Fig. 4 Relative expression of key sex differentiation-related genes

雄性性别分化关键基因 $dmrt1$ (A)、 amh (B)和 $cyp17a1$ (C)在XY精巢、XY卵巢和XX卵巢组织中的表达; 雌性性别分化关键基因 $cyp19a1a$ (D)、 $zar1$ (E)和 $gdf9$ (F)在XY精巢、XY卵巢和XX卵巢组织中的表达; ns表示单因素方差分析显示组间没有显著性差异, *表示有显著性差异($P < 0.05$), **表示有显著性差异($P < 0.01$)

Relative expression of male differentiation genes $dmrt1$ (A), amh (B), and $cyp17a1$ (C) in XY testis, XY ovary, and XX ovary; Relative expression of female differentiation genes $cyp19a1a$ (D), $zar1$ (E), and $gdf9$ (F) in XY testis, XY ovary, and XX ovary; ns means no significant differences in each tissue, *means significant differences ($P < 0.05$) and ** means significant differences ($P < 0.01$) by One-way ANOVA

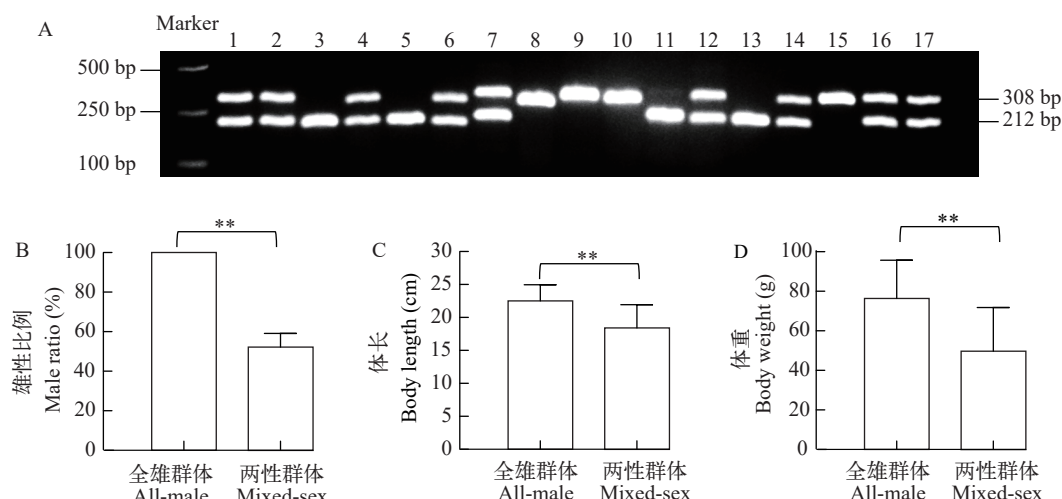


图5 1年龄乌苏里拟鲮全雄群体与两性群体生长对比

Fig. 5 Comparative analysis of growth performance in one-year-old *P. ussuriensis* between all-male and mixed-sex population

引物M2鉴定XY雄性与XY生理雌性繁殖获得的子代基因型(A), 1、2、4、6、7、12、14、16、17为XY雄鱼, 8、9、10、15为XX雌鱼, 3、5、11、13为YY超雄鱼; 1年龄乌苏里拟鲮全雄群体与两性群体的雄性比例(B)、体长(C)和体重(D)对比分析

Genotype identification of offspring mating by XY male and XY female with primer M2 (A), 1, 2, 4, 6, 7, 12, 14, 16, 17 are XY males, 8, 9, 10, 15 are XX females, and 3, 5, 11, 13 are YY supermales; Comparative analysis of male ratio (B), body length (C) and body weight (D) in one-year-old *P. ussuriensis* between all-male and mixed-sex population

数据较多。Pan等^[35]利用AFLP技术鉴定一个雄性特异的DNA片段, 利用基因步移技术鉴定到10569 bp雄性特异片段和10365 bp雌性特异片段。Zhu等^[36]利用简化基因组2b-RAD技术对乌苏里拟鲮5雄和5雌个体进行测序, 获得349个雄性特异的tags, 包含46个Indel和261个SNP。这些tags集中在乌苏里拟鲮8号染色体6.84—23.82 Mb位置, 与本研究结果一致, 本文基于该位置的Indel信息开发了性别特异性引物M1和M2, 并在黑龙江野生群体、河南和湖北的养殖群体中进行了验证。乌苏里拟鲮在我国各大水系都有分布, 但主要集中在黑龙江流域, 目前已在10余个省份中开展了人工养殖^[2], 后续获得其他地区的样本后, 我们会对分子标记的适用性进行补充验证。

3.3 鱼类单性品种创制及其应用

传统生产单雄性养殖鱼类的方法主要通过直接投喂激素和种间杂交技术。激素处理简单, 但存在激素残留问题不符合绿色养殖。种间杂交在罗非鱼中能获得高雄性后代, 但需借助测序鉴定亲本基因型, 时间长, 成本高^[37]。因此利用雌二醇诱导雌性化结合性别连锁分子标记开展乌苏里拟鲮全雄鱼规模化养殖具有重要意义。新品种黄颡鱼“全雄1号”的雄性率高达98%, 较两性群体在鱼种养殖阶段生长速度提高19%以上, 成鱼养殖阶段生长速度提高43.5%—56.8%^[38]。罗非鱼“粤闽1号”的雄性率高达98.31%, 较同期养殖的吉副罗非鱼生长速度快23.77%^[39]。在本研究中, 乌苏里拟鲮全雄养殖群

体的雄性率高达100%, 1年龄的全雄群体体重是两性群体的1.54倍。因此, 规模化养殖全雄性乌苏里拟鲮具有更高的经济价值。

4 结论

本研究发现, 使用10 mg/kg E₂在乌苏里拟鲮10—40dph进行处理, 可诱导乌苏里拟鲮100%雌性化, 且对其生长速率和存活率影响最小。性别分化关键基因在XY生理雌性个体卵巢中的表达模式与普通雌性卵巢中相似。利用全基因组重测序技术开发的性别特异性引物M1和M2可有效鉴定乌苏里拟鲮的遗传型性别。本研究创制的全雄乌苏里拟鲮具有雄性率高、规格整齐和生长速度快的特点, 将更受养殖户的青睐, 推动乌苏里拟鲮产业的发展。

(作者声明本文符合出版伦理要求)

参考文献:

- [1] Mei J, Gui J F. Genetic basis and biotechnological manipulation of sexual dimorphism and sex determination in fish [J]. *Science China Life Sciences*, 2014, **44**(12): 1198-1212. [梅洁, 桂建芳. 鱼类性别异形和性别决定的遗传基础及其生物技术操控 [J]. *中国科学: 生命科学*, 2014, **44**(12): 1198-1212.]
- [2] Wei M Y, Wang S M, Ning J, et al. Cloning and association analysis with growth traits of *igf* gene in Ussuri catfish *Pseudobagrus ussuriensis* [J]. *Fisheries Science*, 2022, **41**(5): 738-748. [魏梦雅, 王思梦, 宁静, 等. 乌苏

- 里拟鲮*igf*基因克隆及其与生长性状关联分析[J]. 水产科学, 2022, **41**(5): 738-748.]
- [3] Pan Z J, Zhu C K, Wang H, *et al.* Gonadal morphogenesis and sex differentiation in cultured Ussuri catfish *Tachysurus ussuriensis* [J]. *Journal of Fish Biology*, 2017, **91**(3): 866-879.
- [4] Pandian T J, Sheela S G. Hormonal induction of sex reversal in fish [J]. *Aquaculture*, 1995, **138**(1-4): 1-22.
- [5] Valdivia K, Jouanno E, Volff J N, *et al.* High temperature increases the masculinization rate of the all-female (XX) rainbow trout “Mal” population [J]. *PLoS One*, 2014, **9**(12): e113355.
- [6] Piferrer F, Anastasiadi D. Do the offspring of sex reversals have higher sensitivity to environmental perturbations [J]? *Sexual Development*, 2021, **15**(1-3): 134-147.
- [7] Xu S Q, Zhang S Y, Duan Y Q, *et al.* Feminization of channel catfish induced by 17 β -estradiol [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2022, **46**(11): 1668-1674. [徐思琪, 张世勇, 段永强, 等. 17 β -雌二醇诱导斑点叉尾鲷雌性化研究[J]. 水生生物学报, 2022, **46**(11): 1668-1674.]
- [8] Liu H Q, Cui S Q, Hou C C, *et al.* YY super-male generated gynogenetically from XY female in *Pelteobagrus fulvidraco* (Richardson) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, **31**(5): 718-725. [刘汉勤, 崔书勤, 侯昌春, 等. 从XY雌鱼雌核发育产生YY超雄黄颡鱼[J]. 水生生物学报, 2007, **31**(5): 718-725.]
- [9] de Bem J C, Fontanetti C S, Senhorini J A, *et al.* Effectiveness of estradiol valerate on sex reversion in *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae) [J]. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 2012, **55**(2): 283-290.
- [10] Wang C L, Guan W Z, Li Y Q, *et al.* Study on 17 β -estradiol induced feminization of *Pelteobagrus fulvidraco* [J]. *South China Fisheries Science*, 2020, **16**(3): 25-30. [王成龙, 关文志, 李永强, 等. 17 β -雌二醇诱导黄颡鱼雌性化的研究[J]. 南方水产科学, 2020, **16**(3): 25-30.]
- [11] Piferrer F. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish [J]. *Aquaculture*, 2001, **197**(1/2/3/4): 229-281.
- [12] Tao B B, Hu W. Research progress on sex control breeding of fish [J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2022, **24**(2): 1-10. [陶彬彬, 胡炜. 鱼类性别控制育种研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2022, **24**(2): 1-10.]
- [13] Liu Y, Chen S L. Fish sex-specific molecular marker screening and marker-assisted sex-controlled breeding: history, progress and prospect [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2023, **47**(11): 34-43. [刘洋, 陈松林. 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[J]. 水产学报, 2023, **47**(11): 34-43.]
- [14] Zhou Y L, Wu J J, Wang Z W, *et al.* Identification of sex-specific markers and heterogametic XX/XY sex determination system by 2b-RAD sequencing in redbtail catfish (*Mystus wyckoides*) [J]. *Aquaculture Research*, 2019, **50**(8): 2251-2266.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] Xiong Y, Wang X, Sun R D, *et al.* Administration of Arginine Vasotocin and modified Isotocin improve artificial propagation and post-spawning survival of female yellow catfish [J]. *Aquaculture*, 2024(587): 740849.
- [18] Capel B. Vertebrate sex determination: evolutionary plasticity of a fundamental switch [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2017, **18**(11): 675-689.
- [19] Xiong Y, Wang S, Guo W J, *et al.* Effects of different animal baits on the gonad development of YY super-male yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2020, **44**(2): 245-252. [熊阳, 王帅, 郭稳杰, 等. 不同动物饵料对YY超雄黄颡鱼性腺发育的影响[J]. 水产学报, 2020, **44**(2): 245-252.]
- [20] Dong R R, Yang S J, Feng R J, *et al.* Complete feminization of catfish by feeding *Limnodilus*, an annelid worm collected in contaminated streams [J]. *Environmental Research*, 2014(133): 371-379.
- [21] Yao D X. Sex differentiation and hormonal sex reversal of *Pelteobagrus fulvidraco* [D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2007: 21-40. [姚道霞. 黄颡鱼性分化及激素诱导性转化研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2007: 21-40.]
- [22] Hu J Q. Study on artificially induced sexual-reversal and gynogenesis in *Pelteobagrus vachelli* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2024: 23-28. [胡景琦. 人工诱导瓦氏黄颡鱼性别逆转及雌核发育研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2024: 23-28.]
- [23] Xiong Y, Jiang Y B, Sun R D, *et al.* Characterization of early gonadal differentiation and estrogen-induced feminization in Chinese longsnout catfish (*Leiocassis longirostris*) [J]. *Aquaculture Reports*, 2024(39): 102373.
- [24] Wenger M, Sattler U, Goldschmidt-Clermont E, *et al.* 17Beta-estradiol affects the response of complement components and survival of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) challenged by bacterial infection [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, **31**(1): 90-97.
- [25] Wang L Y, Qi P P, Chen M, *et al.* Effects of sex steroid hormones on sexual size dimorphism in yellow catfish (*Tachysurus fulvidraco*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2020, **44**(2): 379-388. [王凌宇, 齐飘飘, 陈敏, 等. 性类固醇激素对黄颡鱼雌雄生长二态性的影响[J]. 水生生物学报, 2020, **44**(2): 379-388.]

- [26] Ferguson-Smith M. The evolution of sex chromosomes and sex determination in vertebrates and the key role of DMRT1 [J]. *Sexual Development*, 2007, **1**(1): 2-11.
- [27] Lin Q, Mei J, Li Z, *et al.* Distinct and cooperative roles of *amh* and *dmrt1* in self-renewal and differentiation of male germ cells in zebrafish [J]. *Genetics*, 2017, **207**(3): 1007-1022.
- [28] Chen W T, Liu L, Ge W. Expression analysis of growth differentiation factor 9 (*Gdf9/gdf9*), anti-müllerian hormone (*Amh/amh*) and aromatase (*Cyp19a1a/cyp19a1a*) during gonadal differentiation of the zebrafish, *Danio rerio* [J]. *Biology of Reproduction*, 2017, **96**(2): 401-413.
- [29] Guiguen Y, Fostier A, Piferrer F, *et al.* Ovarian aromatase and estrogens: a pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, **165**(3): 352-366.
- [30] Miao L, Yuan Y, Cheng F, *et al.* Translation repression by maternal RNA binding protein Zar1 is essential for early oogenesis in zebrafish [J]. *Development*, 2017, **144**(1): 128-138.
- [31] Pan Z J, Zhu C K, Chang G L, *et al.* Differential expression analysis and identification of sex-related genes by gonad transcriptome sequencing in estradiol-treated and non-treated Ussuri catfish *Pseudobagrus ussuriensis* [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2021, **47**(2): 565-581.
- [32] Bentley D R. Whole-genome re-sequencing [J]. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2006, **16**(6): 545-552.
- [33] Zhang J J, Zhao R Y, Jiang L, *et al.* Resequencing analysis of the female and male mixed pool of *Esox lucius* [J]. *Freshwater Fisheries*, 2020, **50**(3): 17-25. [张俊杰, 赵瑞阳, 蒋丽, 等. 白斑狗鱼雌、雄基因组混池重测序研究 [J]. *淡水渔业*, 2020, **50**(3): 17-25.]
- [34] 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.
- [35] 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.
- [36] Zhu C K, Liu H Y, Cheng L, *et al.* Identification of sex-specific sequences through 2b-RAD sequencing in *Pseudobagrus ussuriensis* [J]. *Aquaculture*, 2021(539): 736639.
- [37] Pruginin Y, Rothbard S, Wohlfarth G, *et al.* All-male broods of *Tilapia nilotica* × *T. aurea* hybrids [J]. *Aquaculture*, 1975, **6**(1): 11-21.
- [38] Liu H, 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.
- [39] Tilapia “YueMin No. 1” [J]. *China Fisheries*, 2021(4): 92-96. [罗非鱼“粤闽1号” [J]. *中国水产*, 2021(4): 92-96.]

PRODUCTION OF YY SUPER-MALE AND XY ALL-MALE *PSEUDOBAGRUS USSURIENSIS* BY SEX CONTROL TECHNOLOGY

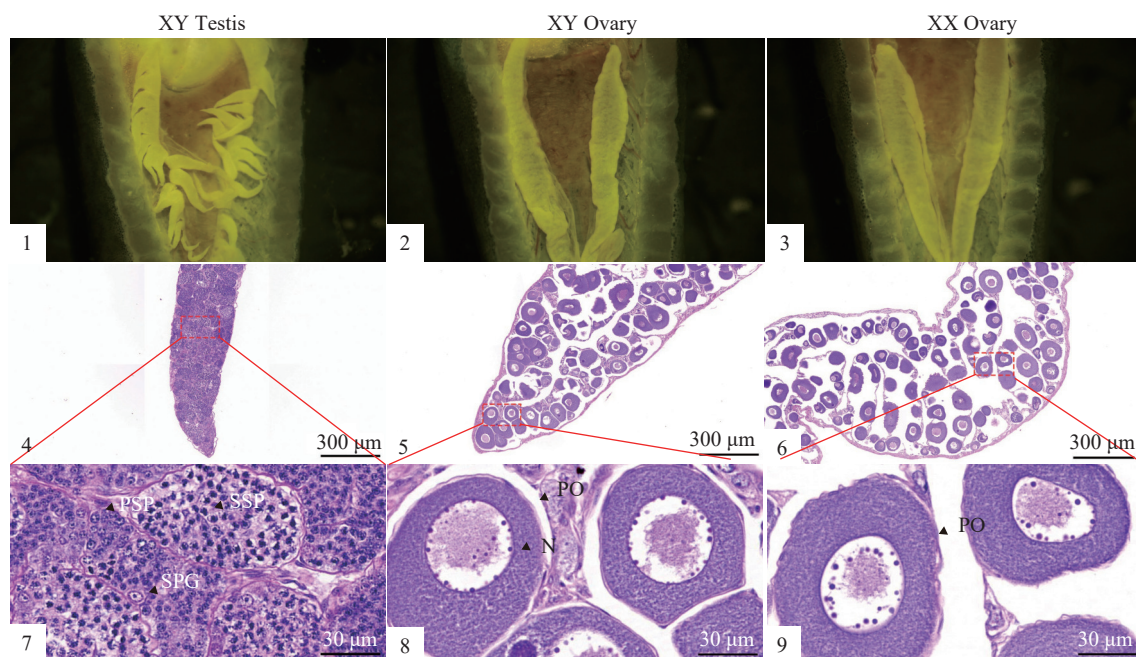
JIANG You-Bo¹, SUN Rui-Dong¹, XIE Yan¹, CHENG Yi¹, CHEN Jian², LI Pei², WANG Zhong-Wei³,
XIONG Yang¹ and MEI Jie^{1,3}

(1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Hubei Hongshan Laboratory, Wuhan 430070, China; 2. Fisheries Research Institute, Wuhan Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430207, China; 3. State Key Laboratory of Breeding Biotechnology and Sustainable Aquaculture, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 4. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: In this study, we investigated the effects of various doses and treatment durations of 17 β -estradiol (E₂) on the growth, survival rate, and sex ratio of *P. ussuriensis*. From 10 to 70dph (days post-hatching), feeding *P. ussuriensis* diets containing 10, 50, and 100 mg/kg E₂ resulted in a 100% feminization rate. However, the growth and survival rates decreased with increasing E₂ concentration, and all fish in the group fed with 150 mg/kg E₂ died. Overall, 10 mg/kg E₂ treatment from 10 to 40dph was found to be the optimal approach for the feminization of *P. ussuriensis*. The expression levels of male key sex differentiation-related genes, such as *dmrt1*, *amh*, and *cyp17a1*, were significantly lower in XY females than that of XY males. The expression levels of female key sex differentiation-related genes including *cyp19a1a*, *zar1*, and *gdf9* in XY females were consistent with those in XX females and were significantly higher than that in XY males. Additionally, whole-genome resequencing revealed 3777645 single nucleotide polymorphisms (SNPs) and 1287509 insertions/deletions (Indels) in 15 female and 15 male *P. ussuriensis*. Among these, 99601 were identified as sex-linked SNPs and 27614 as sex-linked Indels. The sex-linked SNPs were enriched in the 6.84 and 23.82 Mb

regions of chromosome 8. X and Y chromosome specific molecular marker were developed based on sex-linked Indels, which proved effective for the sex identification in *P. ussuriensis*. These markers were well applied to wild populations from the Heilongjiang River as well as farmed populations in Henan and Hubei Province. YY super-male were identified from the offsprings of XY male mating with XY female. Subsequently, using YY super-male *P. ussuriensis* as the male parent, an all-male population was bred with a 100% male ratio. The all-male population at one-year old was 1.54 times heavier than the mixed-sex population. In summary, 10 mg/kg E₂ treatment from 10 to 40dph is the optimal approach for the feminization of *P. ussuriensis*. The sex-linked molecular markers developed by whole-genome resequencing can effectively identify the genotype of *P. ussuriensis* and help produce YY super-male fish. XY all-male *P. ussuriensis* had the characteristics of uniform size and fast growth performance which will be more popular among farmers.

Key words: Sex-specific molecular markers; 17 β -estradiol; Sex reversal; *Pseudobagrus ussuriensis*



图版 I 不同浓度 E₂ 处理后 90dph 乌苏里拟鲮的性腺表型

Plate I Gonadal phenotypes of *P. ussuriensis* treated with different concentrations of E₂ at 90dph

1. XY基因型的精巢; 2. XY基因型的卵巢; 3. XX基因型的卵巢, 波恩氏液固定后性腺形态学观察; 4. XY基因型的精巢; 5. XY基因型的卵巢; 6. XX基因型的卵巢, HE染色后性腺组织学观察; 7—9为4—6对应的放大图; SPG. 精原细胞; PSP. 初级精母细胞; SSP. 次级精母细胞; PO. 初级卵母细胞; N. 细胞核

1. Testis of XY genotype; 2. Ovary of XY genotype; 3. Ovary of XX genotype, fixed by bouin's solution; 4. Testis of XY genotype; 5. Ovary of XY genotype; 6. Ovary of XX genotype, stained by hematoxylin-eosin; 7—9. the corresponding magnified picture of 4—6; SPG. spermatogonia; PSP. primary spermatocytes; SSP. secondary spermatocytes; PO. primary oocyte; N. nucleus