

DOI: 10.11964/jfc.20240514536

圆斑星鲈雌性特异 DNA 分子标记开发及遗传性别鉴定方法的建立



郑卫卫¹, 徐文腾^{1,2}, 刘洋¹, 陈亚东¹, 杨涛¹, 席晓晴³, 刘志鸿¹, 徐东¹, 秦搏⁴, 陈松林^{1,2*}

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国家重点实验室, 山东青岛 266071; 2. 青岛海洋科技中心海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东青岛 266237; 3. 荣成市海洋经济发展中心, 山东威海 264300; 4. 中国水产科学研究院东海水产研究所, 上海 200090

摘要:

【目的】 开发能准确鉴定圆斑星鲈遗传性别的 DNA 分子标记。

【方法】 本研究首先通过全基因组重测序对圆斑星鲈雌性特异 DNA 序列进行了筛选, 然后利用 PCR 扩增的方法对圆斑星鲈雌性特异 DNA 分子标记进行鉴定, 并建立了一种圆斑星鲈遗传性别快速鉴定的方法。

【结果】 通过对 17 尾雄性和 17 尾雌性圆斑星鲈进行全基因组重测序, 筛选出 359 条 W 染色体和 Z 染色体同源且 W 染色体特异性插入的差异 DNA 片段。根据差异 DNA 片段两翼保守序列设计雌雄共享引物对, 采用 PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳方法鉴定出一个插入片段为 69 bp 的雌性特异 DNA 分子标记, 使用该标记可在雌鱼中扩增出 2 条 DNA 条带, 在雄鱼中扩增出 1 条 DNA 条带。进一步利用该 DNA 分子标记和 PCR 扩增方法对另一个养殖群体的 117 尾圆斑星鲈进行了遗传性别鉴定, 鉴定结果与性腺组织切片结果一致。

【结论】 圆斑星鲈雌性特异 DNA 分子标记的开发及遗传性别鉴定方法的建立, 不仅为圆斑星鲈性别决定机制研究提供了重要的遗传学证据, 而且有助于加快圆斑星鲈性别控制育种和全雌苗种培育技术的发展和建立。

关键词: 圆斑星鲈; 雌性特异 DNA 分子标记; 遗传性别鉴定; 基因组重测序

第一作者: 郑卫卫, 从事鱼类遗传育种与育种研究, E-mail: zhengww@ysfri.ac.cn



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

资助项目: 科技创新2030—重大项目(2023ZD0405505); 山东省重点研发计划项目(创新平台)(2022CXPT002); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2023TD19); 山东省泰山学者攀登计划; 中国水产科学研究院东海水产研究所基本科研业务费专项(2016M08)

收稿日期: 2024-05-27

修回日期: 2024-08-02

文章编号:

1000-0615(2025)05-059102-09

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

作者声明本文无利益冲突

©《水产学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)
Copyright © Editorial Office of Journal of Fisheries of China (CC BY-NC-ND 4.0)

圆斑星鲈 (*Verasper variegatus*) (FishBase ID: 6607), 俗称“花斑宝”, 属于鲈形目 (Pleuronectiforme) 鲈科 (Pleuronectidae) 星鲈属 (*Verasper*), 是一种具有重要经济价值的冷水海洋比目鱼类, 主要分布于朝鲜半岛、日本中部和中国沿海^[1-2]。因其肉质鲜美、营养丰富, 圆斑星鲈已成为我国北方地区主要养殖鲈类之一。此外, 研究表明, 圆斑星鲈具有 ZZ/ZW 性别决定系统^[3], 且具有明显的性别生长二态性, 即雌性 (ZW) 生长速率明显快于雄性 (ZZ)^[4]。另外, 在圆斑星鲈早期发育阶段, 雌雄个体之间没有明显的形态差异, 无法在形态上识别圆斑星鲈



的遗传性别, 因此, 开发圆斑星鲷雌性特异 DNA 分子标记、建立圆斑星鲷遗传性别快速鉴定方法, 通过性别控制提高圆斑星鲷养殖群体的雌性比例, 乃至研制出圆斑星鲷全雌苗种, 是推动圆斑星鲷养殖产业健康可持续发展的有效途径。

在圆斑星鲷性别特异分子标记筛选和遗传性别鉴定方面, Ma 等^[3]通过使用扩增片段长度多态性 (amplified fragment length polymorphism, AFLP) 技术对圆斑星鲷进行基因组扫描, 筛选出了圆斑星鲷雌性特异 AFLP 标记。但 AFLP 标记具有显性的遗传特性, 在实际鉴定中可能会出现假阴性。另外, AFLP 标记费用昂贵, 对 DNA 的纯度和内切酶的质量要求很高, 难以实现在养殖现场简易实验条件下的快速检测。因此, 开发圆斑星鲷性别特异 DNA 分子标记、建立准确快速鉴定圆斑星鲷遗传性别的方法是圆斑星鲷性别控制研究和全雌苗种培育的迫切需求。

自 20 世纪 90 年代以来, 使用传统的分子标记技术已在多种鱼类中鉴定出性别特异分子标记, 如随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 标记^[5-7]、AFLP 标记^[8-10]、简单序列重复 (simple sequence repeats, SSR) 标记^[11-12]等。近年来, 随着高通量测序技术的发展, 多种新的技术已被广泛用于鱼类性别特异分子标记的开发, 如双酶切限制性位点相关 DNA 测序 (double digest restriction site-associated DNA sequencing, ddRAD-seq)^[13]、限制性酶切位点相关 DNA 测序 (RAD-seq)^[14-15]、II B 型限制性酶切位点相关 DNA 测序 (2b RAD-seq)^[16-18]、数量性状座位定位 (quantitative trait loci, QTL)^[19]、2b-RAD 结合 QTL 分析^[20]等。此外, 全基因组测序或重测序技术也已被广泛用于鱼类性别特异 DNA 分子标记的开发。例如, Li 等^[21]通过对斑石鲷 (*Oplegnathus punctatus*) 雌性和雄性个体基因组进行比较分析, 鉴定出一个插入片段大小为 18 bp 的雄性特异 DNA 分子标记。Du 等^[22]利用全基因组重测序技术, 在大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*) 中鉴定出多个雄性特异 SNP 和 Indel 标记。此外, Lin 等^[23]通过对比分析大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 雌性和雄性个体的基因组重测序数据, 鉴定出一个长度为 15 bp 的雄性特异性缺失 DNA 分子标记。此

外, Suda 等^[24]通过分析 15 尾雄性和 16 尾雌性太平洋蓝鳍金枪鱼 (*Thunnus orientalis*) 的重测序数据, 鉴定出 250 个雄性特异 SNP 标记。这些新兴技术尤其是全基因组重测序技术, 为更加快速、准确和有效地鉴定性别特异分子标记提供了重要技术支撑。

近年来, 随着基因组测序和组装技术的发展, 在圆斑星鲷基因组研究方面取得了重要进展。Zhao 等^[25]结合单管长片段测序 (single tube long fragment read, stLFR) 和高通量染色体构象捕获技术 (high-through chromosome conformation capture, Hi-C) 组装获得了第一个圆斑星鲷单倍体雌鱼基因组序列, 其大小为 556 Mb, contig N50 为 79.8 kb。Xu 等^[26]利用 Illumina 和 PacBio 测序相结合的方法, 组装获得了 545.34 Mb 的高质量圆斑星鲷单倍体雄鱼基因组序列, 其中 99.91% 的 contig 挂载到了 23 条染色体上, contig N50 达到 15.16 Mb。此外, 为了探究圆斑星鲷性染色体的起源, Xu 等^[27]成功组装出了长度为 20.48 Mb 的圆斑星鲷 W 染色体, 并对圆斑星鲷常染色体和 Z 染色体组装水平进行了优化, 最终获得了包含 24 条染色体 (22 条常染色体+W 染色体+Z 染色体) 的 543.54 Mb 的染色体水平圆斑星鲷基因组序列 (GCA026259375.1), 其 contig N50 达到 22.76 Mb。这些基因组序列的获得为圆斑星鲷性别特异 DNA 分子标记的开发和性别决定机制研究奠定了重要基础。

本研究以 Xu 等^[27]组装获得的高质量圆斑星鲷基因组序列 (GCA026259375.1) 为基础, 通过对 17 尾雄性和 17 尾雌性圆斑星鲷进行全基因组重测序和数据分析, 筛选出大量圆斑星鲷 Z 染色体和 W 染色体同源且 W 染色体特异性插入的差异 DNA 片段。然后, 经过 2 轮 PCR 扩增验证, 最终鉴定出 1 个雌性特异 DNA 分子标记, 并建立了一种快速、准确、操作简单的圆斑星鲷遗传性别鉴定方法。雌性特异 DNA 分子标记的开发和遗传性别快速鉴定方法的建立, 不仅为圆斑星鲷性别决定机制研究奠定了重要理论基础, 而且有助于圆斑星鲷全雌苗种培育技术的发展和建立。

1 材料与方法

1.1 实验对象、DNA 提取和测序

本实验中用于基因组重测序的圆斑星鲷来

自山东省青岛市胶南市某养殖场。首先通过对圆斑星鲷性腺进行石蜡包埋切片和苏木精-伊红(H.E)染色来确定其表型性别, 具体方法参照Chen等^[8]研究。根据性腺组织切片观察结果, 选取17尾雌性和17尾雄性圆斑星鲷进行基因组DNA提取, DNA提取采用海洋动物基因组DNA提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]。然后用超微分光光度计P100(Pultron, 美国)检测DNA的浓度, 用1%琼脂糖凝胶电泳检测DNA的质量。质量检测合格的基因组DNA用于构建34个片段大小为300~500 bp的基因组重测序文库, 然后采用双端150 bp测序模式在Illumina HiSeq 4000平台上进行测序。基因组重测序的原始数据已上传到NCBI的Sequence Read Archive公共数据库(登录号为PRJNA877789)。本研究获得了中国水产科学研究院黄海水产研究所实验动物管理和使用伦理委员会批准, 实验过程中操作人员严格遵守中国水产科学研究院黄海水产研究所实验动物管理和使用伦理规范, 并按照中国水产科学研究院黄海水产研究所动物实验伦理审查委员会制定的规章制度执行。

1.2 雌性特异候选DNA分子标记筛选

使用BWA软件(默认参数)^[28]将17尾雌性个体和17尾雄性个体的重测序reads比对到圆斑星鲷基因组上(GCA026259375.1)。然后, 使用SAMtools软件^[29]将比对后的BAM文件转换为排序的BAM文件, 并进一步分析基因组每个位置的测序深度和reads覆盖率。通过比对分析, 筛选出Z染色体和W染色体同源且W染色体特异性插入的DNA片段(插入型结构变异)。为了避免测序的假阳性和减少候选标记的数量, 本研究中选择至少被5条雌性个体reads覆盖而不被任何雄性个体reads覆盖的W染色体上的DNA序列作为雌性特异候选DNA分子标记。

1.3 雌性特异DNA分子标记鉴定

为了对上述雌性特异候选DNA分子标记进行验证, 利用NCBI的Primer-BLAST软件对雌性特异DNA序列两翼约150 bp的序列(Z染色体和W染色体同源)设计雌性和雄性共享引物对(MF-F和MF-R)。然后用4尾雌性和4尾雄性圆斑星鲷的基因组DNA对每个引物进行分

别扩增, 筛选出能在雌性个体中扩增出2条DNA条带且在雄性个体中扩增出1条DNA条带的引物对。PCR扩增条件: 95℃预变性3 min; 95℃变性30 s, 30个循环; 55℃退火30 s; 72℃延长7 min; 72℃孵育7 min。扩增产物于2%琼脂糖凝胶电泳30 min。然后利用成功扩增出目的条带的引物对另外10尾雌性个体和10尾雄性个体按照相同的扩增条件进行第2次PCR扩增验证。上述两次验证使用的圆斑星鲷样品均来自山东省青岛市胶南市某养殖场。然后, 用Trelief[®]DNA凝胶提取试剂盒(北京擎科生物科技股份有限公司)分别回收纯化雌性个体和雄性个体的目的条带, 并将纯化产物送北京擎科生物科技股份有限公司青岛分公司进行测序。最后, 利用DNAMAN软件的多序列比对分析测序结果, 确定雌性特异DNA标记的序列。

1.4 雌性特异DNA分子标记及遗传性别鉴定方法的应用

利用本研究获得的圆斑星鲷雌性特异DNA分子标记和遗传性别快速鉴定方法, 对乳山市元泽水产养殖有限公司的117尾圆斑星鲷进行遗传性别鉴定。同时对这117尾圆斑星鲷的性腺进行组织石蜡包埋切片和H.E染色, 以确定其性别是否与雌性特异DNA标记鉴定的性别一致。

2 结果

2.1 圆斑星鲷雌性特异候选DNA分子标记的筛选

通过基因组重测序, 本研究共获得17尾雄性和17尾雌性圆斑星鲷的重测序原始数据, 分别为325.36和328.99 Gb, 基因组覆盖度约为35×。此外, 核苷酸统计结果显示, 测序数据的Q20和Q30平均值分别为95.96%和90.40%(表1), 说明测序质量较高, 满足后续分析要求。通过将17尾雄性和17尾雌性圆斑星鲷的重测序reads与高质量圆斑星鲷基因组(GCA026259375.1)进行比对, 获得了大量只被雌性个体reads覆盖而不被任何雄性个体reads覆盖的Z染色体和W染色体同源且W染色体特异性插入的差异DNA片段。最终筛选出359条至少

被 5 条雌性个体 reads 覆盖而不被任何雄性个体 reads 覆盖的差异 DNA 序列作为雌性特异候选 DNA 分子标记 (图 1)。

2.2 圆斑星鲈雌性特异 DNA 分子标记的验证

为了便于通过琼脂糖凝胶电泳方法对扩增差异条带进行辨别, 实验优先选取插入片段大

小为 50~70 bp 的候选 DNA 分子标记进行验证。根据雌性特异 DNA 序列两翼 (Z 染色体和 W 染色体同源) 约 150 bp 的片段设计了 40 对雄性和雌性共享的引物对 (M1~M40)。通过对 4 个雌性和 4 个雄性个体 DNA 进行 PCR 扩增和 2% 琼脂糖电泳发现, 引物对 M9 成功实现了雌性特异性扩增, 即在雌性个体中扩增出长短 2 条

表 1 圆斑星鲈基因组重测序数据统计

Tab. 1 Summary of the genome resequencing data of *V. variegatus*

样品 sample	原始数据 raw read	原始碱基数/bp raw base	Q20值/% Q20	Q30值/% Q30	GC含量/% GC
雌性 female					
F1	81 976 778	24 593 033 400	95.52	89.56	42.59
F2	69 132 629	20 739 788 700	95.47	89.57	42.73
F3	57 232 642	17 169 792 600	95.91	90.31	42.50
F4	78 825 999	23 647 799 700	96.24	90.98	42.67
F5	63 459 042	19 037 712 600	95.21	88.96	42.78
F6	56 209 017	16 862 705 100	94.05	86.35	42.44
F7	60 324 130	18 097 239 000	95.98	90.48	42.22
F8	62 053 393	18 616 017 900	95.58	89.53	42.40
F9	72 721 667	21 816 500 100	95.68	89.74	42.41
F10	51 220 508	15 366 152 400	94.90	87.87	42.39
F11	64 141 269	19 242 380 700	96.26	90.97	42.70
F12	78 723 920	23 617 176 000	96.31	91.16	42.58
F13	66 174 699	19 852 409 700	96.60	91.80	42.46
F14	63 588 636	19 976 590 800	95.18	88.87	42.68
F15	59 072 141	17 721 642 200	96.48	91.34	42.68
F16	54 877 449	16 463 234 700	95.76	89.86	42.77
F17	53 907 012	16 172 103 600	94.73	90.48	42.67
雄性 male					
M1	60 945 560	18 283 668 000	95.40	89.37	42.92
M2	64 272 504	19 281 751 200	96.43	91.38	42.50
M3	61 953 563	18 586 068 900	96.19	90.91	42.44
M4	63 239 668	18 971 900 400	95.85	90.20	42.37
M5	74 003 046	22 200 913 800	96.58	91.73	42.33
M6	64 022 383	19 206 714 900	96.34	91.15	42.44
M7	76 352 543	22 905 762 900	96.81	92.28	42.58
M8	69 067 054	20 720 116 200	96.48	91.46	42.56
M9	74 746 620	21 423 986 000	95.98	90.35	42.41
M10	64 693 147	19 007 944 100	95.58	89.60	42.32
M11	54 251 111	16 275 333 300	96.42	91.34	42.50
M12	71 504 295	21 451 288 500	96.68	91.93	42.66
M13	67 694 245	20 308 273 500	96.83	92.21	42.36
M14	71 366 706	20 410 011 800	96.36	91.19	42.43
M15	50 212 511	15 063 753 200	96.42	91.08	42.57
M16	53 860 012	16 158 003 600	95.78	90.07	42.68
M17	50 353 814	15 106 144 300	96.76	89.50	42.15
平均 average	64 299 403	19 245 703 347	95.96	90.40	42.53

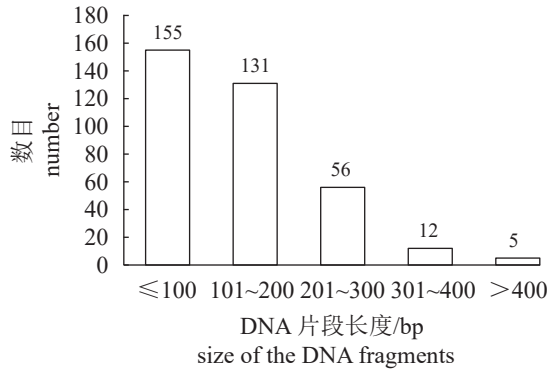


图 1 雌性特异 DNA 片段大小分布

Fig. 1 Statistics for the size distribution of female-specific DNA fragments

条带, 而在雄性个体中仅扩增出一条短条带 (图 2-a)。用引物对 M9 对另外 10 个雌性和 10 个雄性个体 DNA 进行的第 2 轮 PCR 扩增验证

中仍然可以获得相同的扩增条带 (图 2-b)。目的条带序列比对结果显示, 用引物对 M9 扩增得到的雄性个体和雌性个体中共有的短条带长度为 145 bp, 雌性个体中特异性扩增的长条带长度为 214 bp, 即引物对 M9 对应的雌性特异 DNA 插入片段的大小为 69 bp (图 3)。上述结果表明, 这段位于 W 染色体上的 69 bp 的插入片段可以作为圆斑星鲈雌性特异 DNA 分子标记。

2.3 圆斑星鲈雌性特异 DNA 分子标记及遗传性别鉴定方法的应用

为了进一步验证雌性特异 DNA 分子标记的普遍适用性和遗传性别检测方法的可操作性, 实验用其对乳山市元泽水产养殖有限公司养殖群体中的 117 尾圆斑星鲈进行了性别检测, 同时对其性腺组织进行石蜡包埋切片和 H.E 染色。

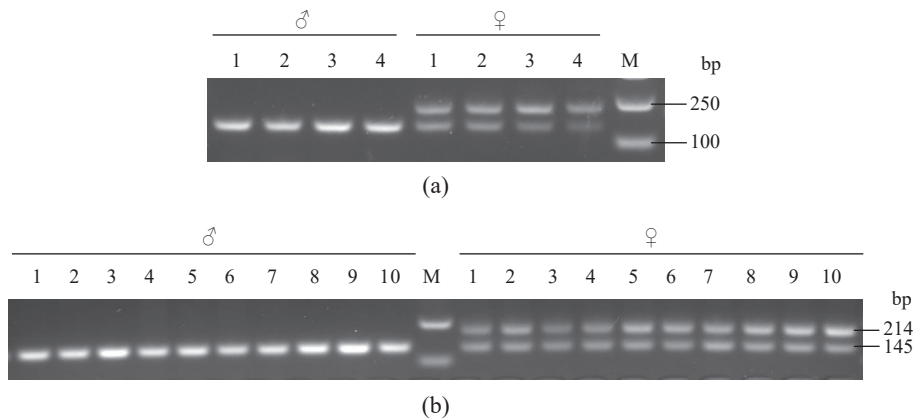


图 2 雌性特异 DNA 分子标记对圆斑星鲈雌雄个体的鉴定

(a) 雌性特异 DNA 分子标记对圆斑星鲈雌雄各 4 个个体的鉴定, (b) 雌性特异 DNA 分子标记对圆斑星鲈雌雄各 10 个个体的鉴定。“♂”代表雄性个体, “♀”代表雌性个体, “M”代表 DL2000 DNA Marker; 下同。

Fig. 2 Genetic sex identification of male and female individuals of *V. variegatus* using the female-specific DNA marker

(a) the genetic sex identification of 4 male and 4 female individuals of *V. variegatus* using female-specific DNA marker, (b) the genetic sex identification of 10 male and 10 female individuals of *V. variegatus* using female-specific DNA marker. “♂” represents the male individuals, “♀” represents the female individuals, “M” represents the DL2,000 DNA Marker; the same below.

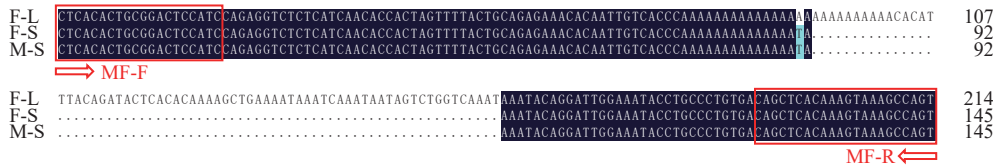


图 3 雌性特异 DNA 分子标记在雌雄个体中扩增的目的条带序列比对及引物位置

“M-S”和“F-S”分别代表在雄性和雌性个体中扩增出的短条带, “F-L”代表在雌性个体中扩增出的长条带, “MF-F”代表上游引物, “MF-R”代表下游引物。

Fig. 3 Sequence alignment of the short band and the long band amplified using the female-specific DNA marker in male and female individuals of *V. variegatus* and the position of primers

“M-S” and “F-S” represent the short band amplified in male and female individuals, “F-L” represents the long band amplified in female individuals, “MF-F” and “MF-R” represent the upstream and downstream primer, respectively.

结果显示, 使用该雌性特异 DNA 分子标记鉴定的性别 (图 4) 与性腺组织切片鉴定的性别结果一致 (图版), 这表明本研究中鉴定的圆斑星鲃雌性特异 DNA 分子标记及建立的遗传性别鉴定方法可用于圆斑星鲃的遗传性别鉴定。

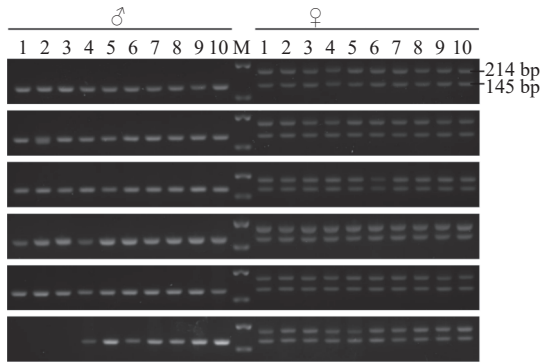


图 4 雌性特异 DNA 分子标记对 117 尾圆斑星鲃性别鉴定的结果

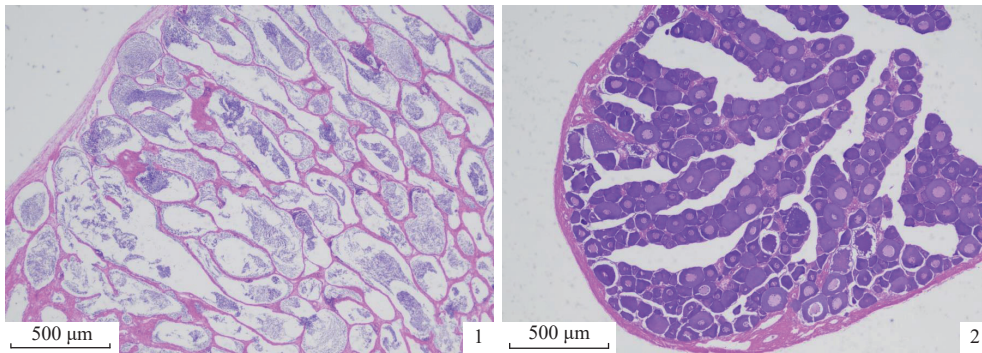
Fig. 4 Genetic sex identification of 117 individuals of *V. variegatus* using the female-specific DNA marker

3 讨论

由于圆斑星鲃雌性个体生长速率明显快于雄性, 因此, 培育圆斑星鲃全雌苗种进行单性养殖是圆斑星鲃养殖产业可持续发展的重大需求。然而, 圆斑星鲃性别特异 DNA 分子标记的缺乏极大地阻碍了其性别控制育种技术的发展和建立。本研究通过对 17 尾雄性和 17 尾雌性圆斑星鲃的基因组重测序数据进行比较分析, 成功地筛选出一个 Z、W 染色体同源且 W 染色体特异性插入的长度为 69 bp 的差异 DNA 序列。经过两轮 PCR 扩增验证和对另一个圆斑星鲃养

殖群体的性别鉴定, 证明该差异 DNA 片段可作为圆斑星鲃雌性特异 DNA 分子标记。近年来, 基因组重测序技术已被大量研究证明可以比传统的分子标记鉴定技术更加准确和有效地鉴定鱼类的性别特异 DNA 分子标记, 如乌鳢 (*Chan-na argus*)^[30]、大黄鱼^[23]、鳊 (*Siniperca chuatsi*)^[31]、大口黑鲈^[22]、蓝鳍金枪鱼^[24]、斑鲃 (*C. maculata*)^[32]、斑石鲷^[21] 等。本研究利用基因组重测序技术鉴定出的圆斑星鲃雌性特异性 DNA 分子标记将极大推动圆斑星鲃全雌性苗种培育技术的发展和建立。

在圆斑星鲃养殖实践中, 迫切需要一种快速、有效、易于操作的遗传性别鉴定方法。本研究中, 实验基于 W 染色体特异性插入 DNA 片段两侧约 150 bp 的 Z、W 染色体同源序列设计了雌性和雄性共享的引物对。经过 PCR 扩增和 2% 琼脂糖凝胶电泳, 可以很容易地根据 DNA 电泳条带的数量来区分雌鱼 (ZW) 和雄鱼 (ZZ), 即雌性个体中可扩增出长短 2 条 DNA 条带、雄性个体中只扩增出 1 条短的 DNA 条带。理论上, 实验也可以识别出 WW 超雌个体 (只有 1 条长的 DNA 条带)。此外, 利用该方法可以在几个小时内得到性别鉴定结果。因此, 该方法具有操作简便、反应条件简单、可避免假阳性等优点, 可用于养殖场简易实验条件下的圆斑星鲃遗传性别鉴定, 节省检测成本, 提高检测效率和可操作性, 极大地促进圆斑星鲃全雌苗种培育技术从理论走向实践。目前, 基于高效、快速 PCR 扩增方法的遗传性别鉴定方法已被广泛应用于多种鱼类的遗传性别鉴定, 如斑石鲷^[21]、大刺鲃 (*Mastacembelus armatus*)^[33]、



图版 圆斑星鲃性腺组织石蜡切片和 H.E 染色

1. 精巢, 2. 卵巢。

Plate Paraffin section and hematoxylin-eosin (H.E) staining of the gonad tissues of *V. variegatus*

1. testis, 2. ovary.

大黄鱼^[23]、鳊^[31]、大口黑鲈^[22]等。

了解鱼类性别决定机制, 对鱼类育种和生产实践具有重要意义。大量研究表明硬骨鱼的性别决定机制是复杂而多样的^[34], 如 ZZ/ZW、ZZ/ZO、XX/XY、XX/XO、X1X1X2X2/X1X2Y 等。同时, 由于很多鱼类性染色体的分化程度较低, 仅通过形态很难对性染色体进行辨别^[34]。因此, 鱼类性别特异 DNA 分子标记的开发将极大促进鱼类性染色体的识别和性别决定机制的研究。沙珍霞等^[35]和王妍妍等^[36]通过染色体核型分析表明圆斑星鲽不含异型性染色体。然而, Ma 等^[3]鉴定出的圆斑星鲽雌性特异 AFLP 标记和本研究中鉴定的圆斑星鲽雌性特异 DNA 分子标记为圆斑星鲽雌性异型配子(雄性: ZZ, 雌性: ZW)的性别决定提供了有力的证据。此外, Xu 等^[27]组装获得了包括 22 条常染色体、1 条 W 染色体和 1 条 Z 染色体共 24 条染色体的雌性圆斑星鲽染色体水平基因组序列, 表明圆斑星鲽确实存在 ZZ/ZW 性别决定系统。这些研究结果不仅为圆斑星鲽性别决定机制和性染色体进化研究提供了重要理论参考, 而且为圆斑星鲽性别控制育种提供了重要理论支撑。

利用雌性特异 DNA 分子标记对圆斑星鲽遗传性别进行快速、准确、有效的鉴定, 将极大促进圆斑星鲽全雌苗种培育技术的建立和发展。根据 Xu 等^[37]培育黄姑鱼 (*Nibea albiflora*) 全雌苗种的方法, 实验设计了圆斑星鲽全雌苗种培育的理想技术路线: 首先用 17 α -甲基睾酮浸泡处理性别尚未分化的圆斑星鲽鱼苗产生伪雄鱼 (ZW, ♂) [利用本研究鉴定的雌性特异 DNA 分子标记对伪雄鱼 (ZW, ♂) 和正常雄鱼 (ZZ, ♂) 进行区分]; 然后, 将伪雄鱼 (ZW, ♂) 与正常雌鱼 (ZW, ♀) 杂交, 产生超雌鱼 (WW, ♀) [利用本研究鉴定的雌性特异 DNA 分子标记对正常雌鱼 (ZW, ♀) 和超雌鱼 (WW, ♀) 进行区分]; 最后, 将超雌鱼与正常雄鱼 (ZZ, ♂) 杂交, 获得圆斑星鲽全雌苗种 (ZW, ♀)。上述培育圆斑星鲽全雌苗种的技术路线有待在生产实践中进一步验证。

本研究通过对圆斑星鲽雌鱼和雄鱼基因组重测序数据进行比较分析, 筛选出 1 个 69 bp 的 W 染色体特异插入 DNA 片段, 并通过 PCR 扩增证明其可以作为圆斑星鲽遗传性别鉴定的性别特异 DNA 分子标记。同时, 基于该分子标记建立了一种基于 PCR 扩增、准确、快速、有

效的圆斑星鲽遗传性别鉴定方法, 该方法在实验室和养殖场条件下均适用。上述研究结果不仅为圆斑星鲽性别决定机制研究提供了新的见解, 而且也圆斑星鲽性别控制育种技术的发展和建立提供重要的理论支撑。

参考文献 (References):

- [1] Yoshiharu N, Tsuneo F, Masato W. Studies on spotted halibut (*Verasper variegatus* temminck & schlegel)-I[J]. Bulletin of the Fukushima Prefectural Fisheries Experimental Station, 1999, 8: 5-16.
- [2] Wada T, Kamiyama K, Shimamura S, et al. Habitat utilization, feeding, and growth of wild spotted halibut *Verasper variegatus* in a shallow brackish lagoon: Matsukawaura, northeastern Japan[J]. *Fisheries Science*, 2011, 77(5): 785-793.
- [3] 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(1): 9-14.
- [4] Dou S Z. Life history cycles of flatfish species in the Bohai Sea, China[J]. *Netherlands Journal of Sea Research*, 1995, 34(1-3): 195-210.
- [5] 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(5): 235-239.
- [6] Vale L, Dieguez R, Sánchez L, et al. A sex-associated sequence identified by RAPD screening in gynogenetic individuals of turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. *Molecular Biology Reports*, 2014, 41(3): 1501-1509.
- [7] Xia X H, Zhao J, Du Q Y, et al. Cloning and identification of a female-specific DNA marker in *Paramisgurnus dabryanus*[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2011, 37(1): 53-59.
- [8] 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.
- [9] Lee B Y, Coutanceau J P, Ozouf-Costaz C, et al. Genetic and physical mapping of sex-linked AFLP markers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Marine Biotechnology*, 2011, 13(3): 557-562.
- [10] Pan Q W, Feron R, Yano A, et al. Identification of the master sex determining gene in northern pike (*Esox lucius*) reveals restricted sex chromosome differentiation[J]. *PLoS Genetics*, 2019, 15(8): e1008013.
- [11] 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.
- [12] Shikano T, Herczeg G, Merilä J. Molecular sexing and popula-

- tion genetic inference using a sex-linked microsatellite marker in the nine-spined stickleback (*Pungitius pungitius*)[J]. *BMC Research Notes*, 2011, 4: 119.
- [13] Fowler B L S, Buonaccorsi V P. Genomic characterization of sex-identification markers in *Sebastes carnatus* and *Sebastes chrysomelas* rockfishes[J]. *Molecular Ecology*, 2016, 25(10): 2165-2175.
- [14] Palaiokostas C, Bekaert M, Davie A, et al. Mapping the sex determination locus in the Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) using RAD sequencing[J]. *BMC Genomics*, 2013, 14: 566.
- [15] Palaiokostas C, Bekaert M, Khan M G Q, et al. Mapping and validation of the major sex-determining region in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) using RAD sequencing[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e68389.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] Zhou Y, Liu H Y, Wang X H, et al. QTL fine mapping for sex determination region in bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) and comparison with silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*)[J]. *Marine Biotechnology*, 2020, 22(1): 41-53.
- [20] Zhou Y L, Wang Z W, Guo X F, et al. Construction of a high-density genetic linkage map and fine mapping of QTLs for growth and sex-related traits in red-tail catfish (*Hemibagrus wyckioides*)[J]. *Aquaculture*, 2021, 531: 735892.
- [21] Li M, Xu H, Xu W T, et al. Isolation of a male-specific molecular marker and development of a genetic sex identification technique in spotted knifejaw (*Oplegnathus punctatus*)[J]. *Marine Biotechnology*, 2020, 22(4): 467-474.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] Suda A, Nishiki I, Iwasaki Y, et al. Improvement of the Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*) reference genome and development of male-specific DNA markers[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 14450.
- [25] Zhao N, Guo H B, Jia L, et al. Genome assembly and annotation at the chromosomal level of first Pleuronectidae: *Verasper variegatus* provides a basis for phylogenetic study of Pleuronectiformes[J]. *Genomics*, 2021, 113(2): 717-726.
- [26] Xu X W, Chen Z F, Liu C L, et al. Chromosome-level genome assembly of the *Verasper variegatus* provides insights into left eye migration[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2022, 9: 1045052.
- [27] Xu X W, Sun P C, Gao C B, et al. Assembly of the poorly differentiated *Verasper variegatus* W chromosome by different sequencing technologies[J]. *Scientific Data*, 2023, 10(1): 893.
- [28] Li H. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM[J]. arXiv, 2013, 0: 1-3.
- [29] Danecek P, Bonfield J K, Liddle J, et al. Twelve years of SAMtools and BCFtools[J]. *GigaScience*, 2021, 10(2): giab008.
- [30] 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): 98733-98744.
- [31] 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.
- [32] 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 maculata*[J]. *Aquaculture*, 2020, 528: 735499.
- [33] 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.
- [34] Mei J, Gui J F. Genetic basis and biotechnological manipulation of sexual dimorphism and sex determination in fish[J]. *Science China Life Sciences*, 2015, 58(2): 124-136.
- [35] 沙珍霞, 陈松林, 田永胜. 圆斑星鲷染色体核型分析[J]. *中国水产科学*, 2007, 14(3): 478-481.
- Sha Z X, Chen S L, Tian Y S. Chromosome karyotypic analysis of spotted flounder *Verasper variegatus*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2007, 14(3): 478-481 (in Chinese).
- [36] 王妍妍, 柳学周, 刘新富, 等. 圆斑星鲷染色体与多种显带的形态特征分析[J]. *水产学报*, 2011, 35(11): 1607-1616.
- Wang Y Y, Liu X Z, Liu X F, et al. Analysis of the karyotype and banding patterns of *Verasper variegatus*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(11): 1607-1616 (in Chinese).
- [37] Xu D D, Yang F, Chen R Y, et al. Production of neo-males from gynogenetic yellow drum through 17 α -methyltestosterone immersion and subsequent application for the establishment of all-female populations[J]. *Aquaculture*, 2018, 489: 154-161.

Identification of a female-specific DNA marker and development of genetic sex identification method in *Verasper variegatus*

ZHENG Weiwei¹, XU Wenteng^{1,2}, LIU Yang¹, CHEN Yadong¹, YANG Tao¹, XI Xiaoqing³,
LIU Zhihong¹, XU Dong¹, QIN Bo⁴, CHEN Songlin^{1,2*}

1. State Key Laboratory of Mariculture Biobreeding and Sustainable Goods, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;
2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao Marine Science and Technology Center, Qingdao 266237, China;
3. Rongcheng Marine Economic Development Center, Weihai 264300, China;
4. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China

Abstract: *Verasper variegatus*, a marine flatfish, holds significant nutritional and economic value and exhibits sexual dimorphism in growth, with females growing faster than the males. However, to date, no rapid, effective, and universal sex-specific DNA marker has been available for genetic sex identification and sex-controlled breeding in *V. variegatus*. To address this, we performed whole genome resequencing on 17 male and 17 female individuals to identify female-specific DNA sequences. Through PCR amplification, we identified a female-specific DNA marker and established a genetic sex identification method. Our results revealed 359 potential female-specific DNA sequences following reads mapping, sequencing depth, and coverage analysis. Primer pairs targeting approximately 150 bp DNA sequences flanking these regions were designed. After two rounds of PCR verification, a 69 bp insertion was identified as a female-specific marker, accurately distinguishing genetic sex via PCR amplification and 2% agarose gel electrophoresis. Further validated using 117 individuals from another breeding population confirmed the accuracy of this marker and method, with genetic sex results aligning with phenotypic determined by gonad histology. The development of this female-specific DNA marker and the genetic sex identification method provides crucial genetic insights into the sex determination mechanism of *V. variegatus* and accelerates the implementation of sex-controlled breeding and all-female breeding techniques.

Key words: *Verasper variegatus*; female-specific DNA marker; genetic sex identification; genome resequencing

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

Funding projects: STI2030-Major Projects (2023ZD0405505); Shandong Key R & D Program (2022CXPT002); Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2023TD19); Taishan Scholar Climbing Project of Shandong Province; Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, ECSFRI, CAFS (2016M08)