

黄姑鱼 (*Nibea albiflora*) *gsdf* 基因的克隆及表达分析

孙 莎^{1,2}, 韩兆方^{1,2}, 李完波^{1,2}, 叶 坤^{1,2}, 林爱强^{1,2}, 崔晓莹^{1,2}, 王志勇^{1,2}

(1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021; 2. 农业部东海海水健康养殖重点实验室, 福建 厦门 361021)

[摘要] 为探索 *gsdf* (gonadal soma derived factor) 基因对黄姑鱼性别分化和性腺发育的作用, 克隆了黄姑鱼 *gsdf* 基因 ORF 序列全长, 并运用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术检测了该基因在黄姑鱼不同组织和不同发育时期性腺中的表达情况。结果显示: 黄姑鱼 *gsdf* 基因开放阅读框长 648 bp, 可编码 215 个氨基酸, 含有 TGF- β 超家族的保守功能结构域; 组织表达分析结果显示, 黄姑鱼 *gsdf* 基因主要集中在精巢中表达; 在 23 °C 左右水温下, 孵化后 40 d 的遗传雄性鱼苗性腺中开始检测到 *gsdf* 基因有明显表达 (此时组织学上尚看不出精巢形态), 49 d 后表达量迅速升高, 孵化 120 d 后 (精巢分化完成) 表达量达到高峰, 随后表达量开始下降, 直到黄姑鱼精巢成熟之后呈现稳定表达。上述结果提示, 黄姑鱼 *gsdf* 基因与黄姑鱼性别决定和分化发育过程密切相关。

[关键词] 黄姑鱼; *gsdf* 基因; 组织表达; 时序表达

[中图分类号] Q 786; S 965.325

Cloning and Expression Analysis of *gsdf* Gene in the Yellow Drum (*Nibea albiflora*)

SUN Sha^{1,2}, HAN Zhaofang^{1,2}, LI Wanbo^{1,2}, YE Kun^{1,2}, LIN Aiqiang^{1,2}, CUI Xiaoying^{1,2}, WANG Zhiyong^{1,2}

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea of Ministry of Agriculture, Xiamen 361021, China)

Abstract: In order to study the function of *gsdf* (gonadal soma derived factor) in sex differentiation and gonad development in the yellow drum (*Nibea albiflora*), the ORF (open reading frame) sequence of *gsdf* gene was obtained through molecular and bioinformatics technique. And the expression profile of *gsdf* in different tissues and different development stages of gonads was assayed by qRT-PCR (quantitative real time PCR). Results showed that the *gsdf* contained a 648 bp open reading frame encoding a protein of 215 amino acids with a conserved domain shared by the TGF- β superfamily. The qRT-PCR analysis revealed that *gsdf* mainly expressed in testis of the yellow drum. Hatching and rearing at 23 °C, the *gsdf* expression in the genetic males was detected from 40 dph (day post hatch) while the testis was unidentifiable by histology. The expression of *gsdf* went up rapidly after 49 dph, and reached to the maximum peak on 120 dph when the testis was fully differentiated. Subsequently, the expression of *gsdf* showed down-regulation and it tended to be stabilized after the testis was fully mature. These results indicated that *gsdf* was tightly related to the testis differentiation and development in *N. albiflora*.

[收稿日期] 2017-12-04

[修回日期] 2018-02-22

[基金项目] 厦门市海洋经济发展专项资金项目 (14GZY70NF34); 福建省农业高校产学研合作重大项目 (2014N5011)

[作者简介] 孙莎 (1993—), 女, 硕士生, 从事鱼类遗传育种研究。通信作者: 王志勇 (1963—), 男, 教授, 博导, 从事水生生物遗传育种与生物技术研究。E-mail: zywang@jmu.edu.cn。

<http://xuebaobangong.jmu.edu.cn/zkb>

Keywords: yellow drum (*Nibea albiflora*); *gsdf* (gonadal soma derived factor); tissue expression pattern; temporal expression

0 引言

长期以来,性别一直是生命科学领域研究的热点命题。鱼类在动物系统进化中处于承前启后的地位,其物种数量占已知脊椎动物的 1/2 以上^[1],因而其性别决定的遗传基础及其机制研究一直广受关注。大量研究表明,脊椎动物的性别异型主要是进化过程中的遗传选择造成的^[2],是胚胎、幼体和成体发育生长过程中基因差异表达的产物^[3]。与控制其他组织生长发育的基因相比,涉及性腺分化发育的基因呈现明显的多变性和可塑性^[4]。

随着研究的不断深入,鱼类性别的关键基因除了转录因子家族中的“明星基因”,如 *sry* 基因^[5]和 *dmrt1* 基因^[6]等,很多非转录因子家族的基因也被发现在性别决定中起着非常重要的作用。其中转化生长因子 β 超家族 (TGF- β) 的成员在性别分化和发育过程中发挥着举足轻重的作用,如吕宋青鳉 (*Oryzias luzonensis*)^[7]和裸盖鱼 (*Anoplopoma fimbria*)^[8]中的 *gsdf* 基因,银汉鱼 (*Odontesthes hatcheri*) 中的 *amhy* 基因^[9],红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*) 中的 *amhr II* 基因^[10]以及罗非鱼 Y 染色体上重复的 *amh* 基因^[11]等。TGF- β 超家族成员在细胞生长、分化、凋亡及细胞动态平衡等方面发挥重要作用,其中 *bmp* (bone morphogenetic proteins)、*amh* (antimüllerian hormone) 等基因均涉及脊椎动物性腺的分化过程^[12]。*gsdf* (gonadal soma derived factor) 基因作为 TGF- β 超家族中的一种细胞因子,最先在虹鳉 (*Oncorhynchus myliss*) 的原始生殖细胞 (primordial germ cell, 简称 PGC) 中被分离鉴定。在孵化后 40 d 的虹鳉胚胎中, *gsdf* 基因特异地在其性腺细胞表达,该基因对于维持虹鳉原始生殖细胞和精原细胞的正常增殖发育具有重要作用^[13]。Yasushi 等^[14]以寻找 *dmy* 基因下游的靶基因为目的构建了青鳉各个发育时期的 cDNA 文库,并从中筛选出与虹鳉 *gsdf* 基因同源的下流基因。为了进一步揭示 *gsdf* 基因在青鳉性别分化中的作用, Yasushi 等人成功克隆了青鳉的 *gsdf* 基因并检测了该基因在青鳉发育各个时期的表达模式,研究结果表明 *gsdf* 基因在雄性青鳉的胚胎中高表达,而雌性个体中几乎不表达,性逆转的雄性个体中 *gsdf* 基因表达明显下降。随后在吕宋青鳉 (*O. luzonensis*) 中, *gsdf* 被发现取代了 *dmy* 成为该物种的性别决定主效基因^[13]。该研究结果再次揭示和肯定了 *gsdf* 基因在鱼类性别分化过程的重要角色。利用 CRISPR/Cas9 技术靶向敲除罗非鱼中的 *gsdf* 基因,导致遗传雄性 (XY) 的个体发生性逆转,过表达 *gsdf* 基因致使遗传为雌性 (XX) 个体的性腺发育为精巢,表明 *gsdf* 基因在罗非鱼的性别决定中也发挥了关键的作用^[15]。因此,探索 *gsdf* 基因在鱼类性别决定通路中的角色,对解析性别决定和分化的分子机理具有重要意义。

黄姑鱼 (*Nibea albiflora*) 隶属于鲈形目 (Perciforms)、石首鱼科 (Sciaenidae)、黄姑鱼属 (*Nibea*), 主要分布在我国沿海、朝鲜半岛及日本南部海域^[16]。黄姑鱼表现出显著的雌雄二态生长模式, 15 月龄黄姑鱼的雌性个体体重约是雄性个体的 1.3 倍^[17], 开展全雌化养殖, 可望在不增加养殖量的情况下大幅度提高产量。高效地挖掘和筛选黄姑鱼性别决定分化相关基因并探讨其基因功能对于阐明黄姑鱼性别决定的分子机理具有重要意义。本研究拟克隆黄姑鱼 *gsdf* 基因的 ORF 序列全长, 利用实时荧光定量 PCR 技术进一步检测和分析该基因在不同组织和不同发育时期性腺中的表达情况, 以期阐明黄姑鱼的性别决定和分化机理提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用的黄姑鱼均为人工养殖个体, 采自福建省宁德市金铃水产科技有限公司。其中 26 日龄至 390 日龄的样品均为 2016 年 3 月繁育的鱼苗, 育苗期间水温 22 ~ 25 °C, 盐度为 25 ~ 31。成鱼 (540 日龄) 为性成熟但未产卵的样品, 系来自 2015 年秋季繁育的鱼苗。

黄姑鱼遗传性别鉴定的材料取自于其鳍条组织, 置于 95% 的乙醇中, -20°C 保存备用。基因克隆的材料取自于性成熟黄姑鱼的性腺组织, 组织表达分析的材料取自于性成熟黄姑鱼的性腺、肌肉、脾脏、胃、心脏、肝脏、脑、肾、眼和头肾, 不同发育阶段的材料分别取自孵化后 26 d、37 d、40 d、49 d、64 d、93 d、120 d、180 d (6 月龄)、240 d (8 月龄)、390 d (13 月龄) 及 540 d (18 月龄, 性腺已发育成熟) 的黄姑鱼, 这些材料置于 RNA 保护液中, -80°C 保存备用。

1.2 实验试剂

DNA 提取试剂盒购自上海捷瑞生物工程有限公司; DNA 凝胶回收试剂盒、GoScript™ Reverse Transcription System (Promega) 购自上海泰京生物技术有限公司; Trans Zol Up Plus RNA Kit、感受态细胞 DH5 α 购自北京全式金生物技术有限公司; TaqDNA 聚合酶、pMD19-T、SYBR® Premix Ex Taq™ II 试剂盒购自宝生物工程 (大连) 有限公司 (TaKaRa); 引物由华大基因合成。

1.3 实验方法

1.3.1 黄姑鱼遗传性别鉴定

由于幼小的黄姑鱼个体无法通过外部形态与性腺组织学观察辨别其雌雄, 需要通过提取基因组 DNA 并利用本实验室开发的黄姑鱼性别特异分子标记引物 (见表 1) 对其进行遗传性别鉴定^[18]。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测判定: 遗传雄性黄姑鱼个体能检测到一条 258 bp 的条带, 而遗传雌性黄姑鱼个体没有扩增条带。

1.3.2 总 RNA 提取及 cDNA 链的合成

使用 Trans Zol Up Plus RNA Kit 试剂盒进行 RNA 提取, 使用 GoScript™ Reverse Transcription System (Promega) 试剂盒按照其说明书合成 cDNA 的第一条链, 后用内参基因 β -actin 引物 (序列见表 1) 检测反转录效果。

表 1 基因克隆和荧光定量所用到的引物

Tab. 1 Primers for gene cloning and qRT-PCR experiments

引物名称 Primer name	序列 Sequence (5' - 3')	用途 Usage
MS-F	GCAAGGACAAGCCGAACAAG	性别鉴定 Sex identification
MS-R	TCGTCACAAATATGGAARWATKGAT	
β -actin-F	TTATGAAGGCTATGCCCTGCC	内部参照 Internal control
β -actin-R	TGAAGGAGTAGCCACGCTCTGT	
M13-47	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC	阳性克隆鉴定 Identification of positive clones
RV-M	AGCGGATAACAATTTACACAGGA	
<i>gsdf</i> -orf-F	ATGTCCTTTGCGTTCATTGTCA	ORF 扩增 Amplification of ORF
<i>gsdf</i> -orf-R	TTACTCTATGCCGGGCTGCTG	
<i>gsdf</i> -F	CGCCACTGAAGAGCCCAATAGC	<i>gsdf</i> 基因定量 Quantification of <i>gsdf</i>
<i>gsdf</i> -R	GCACCTGGACCATCACTGTCTG	

1.3.3 黄姑鱼 *gsdf* 基因的克隆

利用生物信息学方法从本实验室的黄姑鱼性腺转录组学研究数据中获得 *gsdf* 的开放阅读框序列, 根据拼接的参考序列设计引物 *gsdf*-orf-F/R (序列见表 1), 以黄姑鱼成鱼的性腺 cDNA 为模板扩增 *gsdf* 的开放阅读框片段。产物经琼脂糖凝胶电泳验证后, 利用 DNA 回收试剂盒纯化回收并连入 pMD19-T 载体, 转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 挑取阳性克隆送到华大基因有限公司进行测序。用 DNAMAN 软件对测序所得数据和参考序列进行比对分析, 并使用 Primer Premier 5.0 软件 (<http://www.premierbiosoft.com/>) 设计荧光定量 PCR 引物 *gsdf*-F/R (序列见表 1)。

1.3.4 *gsdf* 基因的生物信息学分析

分析蛋白质的物理参数: <http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam;>

<http://xuebaobangong.jmu.edu.cn/zkb>

预测信号肽: <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>;

分析蛋白质结构域: 用 NCBI 的 Conserved Domains (CD-Search) 程序;

序列同源性分析: DNAMAN 软件;

氨基酸多重序列比对: BioEdit 软件;

构建系统进化树: MEGA 5.0 软件 (邻接法, Neighbor-Joining, NJ)。

1.3.5 实时荧光定量 PCR

选择 β -actin 基因为内参基因 (引物为 β -actin-F/R, 序列见表 1), 使用 LightCycler 480 (Roche, USA) 荧光定量 PCR 仪, 按照 SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒使用说明, 采用 qRT-PCR 检测 *gsdf* 基因在不同组织和不同发育时期的表达情况 (引物 *gsdf*-F/R 序列见表 1), 每个样品做 3 个重复。

1.3.6 数据处理

对实时荧光定量 PCR 结果, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算每个样品目的基因的相对表达量, 利用 t -检验分析比较各组织不同性别中 *gsdf* 基因的雌雄表达量差异。

2 结果

2.1 遗传性别鉴定

对无法辨别性别的苗期个体进行遗传性别鉴定的结果如图 1 所示。由图 1 可知, 遗传雄性个体可以检测到 1 条 258 bp 左右的特异条带, 而遗传雌性个体则没有扩增条带。

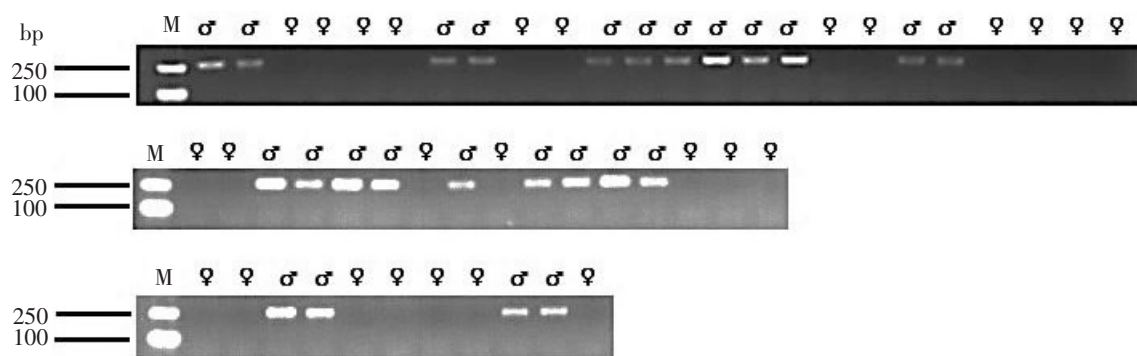
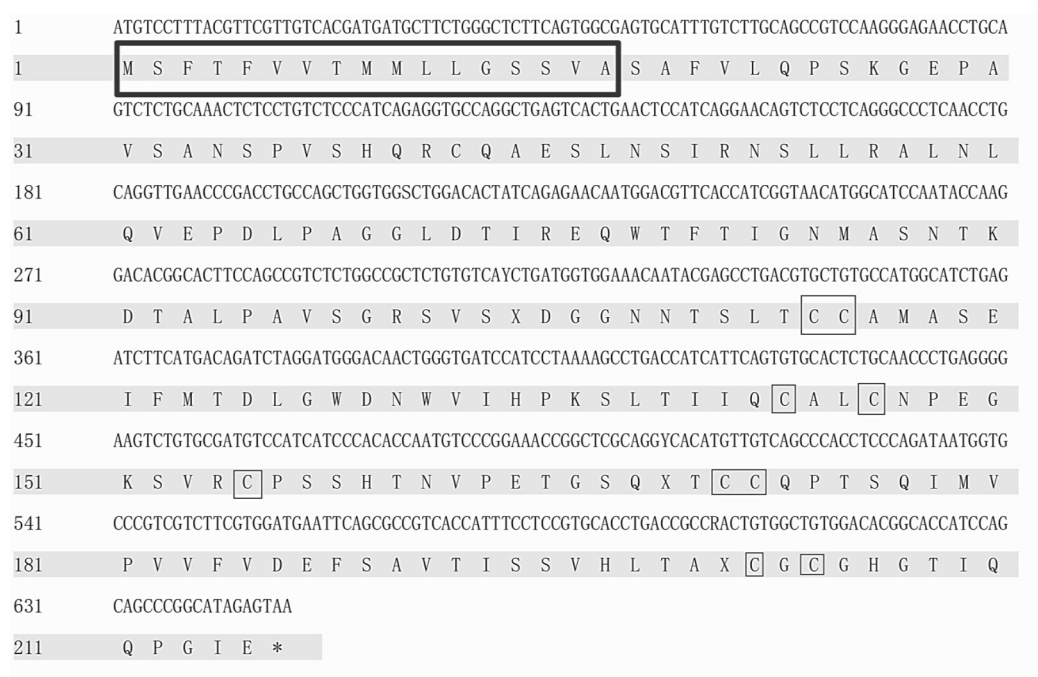


图 1 黄姑鱼遗传性别鉴定

Fig.1 Detection of genetic sex in *Nibea albiflora*

2.2 *gsdf* 基因的结构

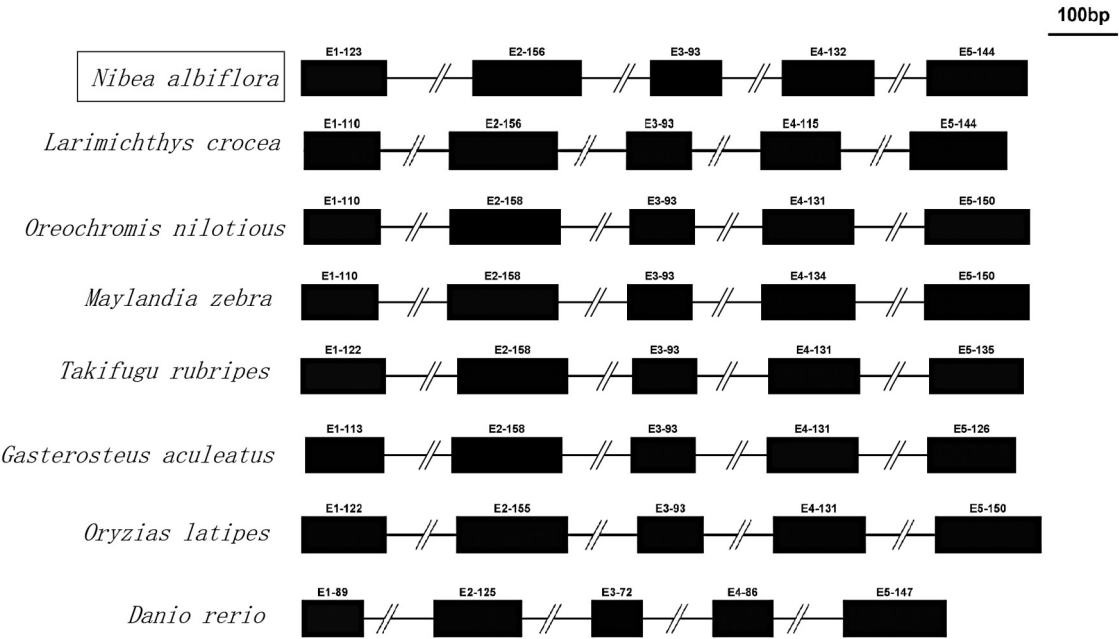
克隆获得黄姑鱼 *gsdf* 基因 ORF 长度为 648 bp, 编码 215 个氨基酸 (见图 2), 预测蛋白质相对分子质量为 22820.76 u, 理论等电点 (isoelectric point, pI) 为 5.22。黄姑鱼的 *gsdf* 与 GenBank 中可查到基因组序列的其他 7 种鱼类的 *gsdf* 基因一样, 均包含 5 个外显子和 4 个内含子 (见图 3)。黄姑鱼 *gsdf* 编码蛋白有一个信号肽, 包含 19 个氨基酸 (图 2 中深色方框所示)。图 4 为用 ClustalW 对 12 种不同鱼类 GSDF 氨基酸序列进行比对的结果, TGF- β 超家族保守结构域位于黄姑鱼 GSDF 第 114 ~ 204 氨基酸处, 图 4 中星号标注为 9 个保守的半胱氨酸残基。表 2 为黄姑鱼 GSDF 与其他 10 种鱼类 GSDF、以及几种鱼类 AMH、TGF- β 或 BMP 氨基酸序列比较分析的结果, 从表 2 中可见: 黄姑鱼 GSDF 与鲈鱼 GSDF 同源性最高, 达 70.2%; 其次是石斑鱼 (67.6%) 和牙鲆 (64.5%), 与同属于石首鱼科的大黄鱼 GSDF 同源性为 63.4%, 与斑马鱼 GSDF 的同源性最低 (只有 31.1%), 与鱼类 TGF- β 及 AMH、BMP 等其他 TGF- β 超家族成员的同源性则均低于 20%。系统进化树 (见图 5) 分析结果显示各种鱼类的 GSDF 同聚为一枝, 而 TGF- β 超家族的其他成员分别聚为一枝; 在 GSDF 分枝内部, 黄姑鱼 GSDF 与大黄鱼 GSDF 首先聚合为同一个小分枝, 显示两者的亲缘关系最近, 而与斑马鱼的亲缘关系最远。



说明:深色框内的序列表示一个信号肽,浅色方框内为 9 个保守的半胱氨酸残基。
Notes:The sequence in dark box represented for a signal peptide, the light box indicated nine cysteine residues.

图 2 黄姑鱼 *gsdf* 基因 ORF 核酸序列及对应氨基酸序列

Fig.2 Nucleic acid sequences and amino acid sequences of *gsdf* gene ORF in *N. albiflora*



说明:黑色方框代表外显子,外显子编号及长度标注其上方,断裂线代表内含子
Notes: Exons were represented by black boxes,while the number given above it represented the relative base pair sizes of exons.Introns were represented by break-lines.

图 3 黄姑鱼与其他 7 种鱼类的 *gsdf* 基因结构图

Fig.3 The *gsdf* gene structure diagram of *N. albiflora* and other 7 fishes

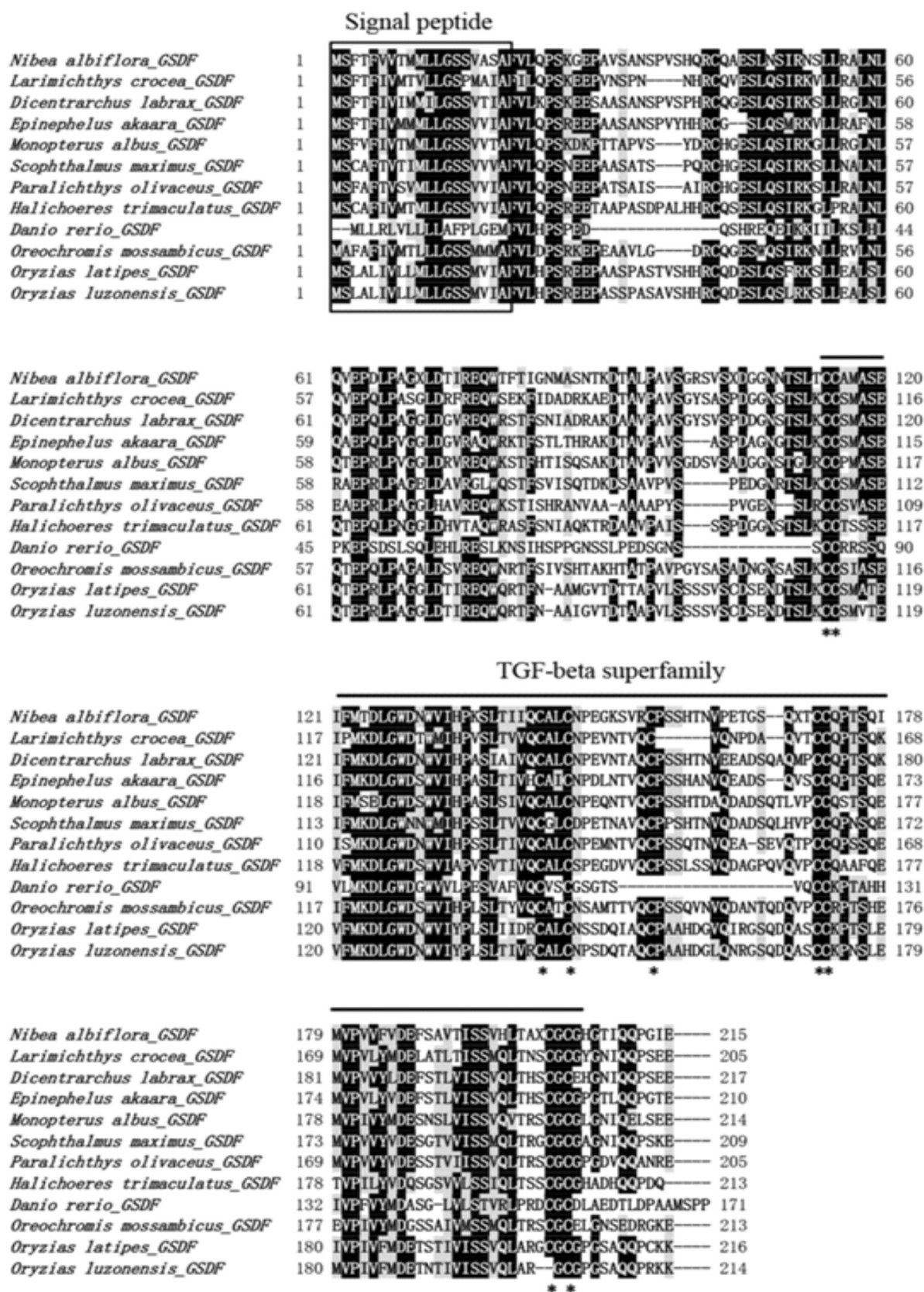


图 4 黄姑鱼与其他鱼类 GSDF 氨基酸序列的比较

Fig.4 Alignment of amino acid sequences of GSDF in *N. albiflora* and other fishes

表 2 黄姑鱼 GSDf 氨基酸序列与其他鱼类 GSDf 及 TGF-β 超家族其他成员的同源性分析
Tab. 2 Homology analysis of amino acid sequences of GSDf in *N. albiflora* and other fishes and other members of TGF-β superfamily

物种 Species	GenBank 检索号 Accession number	氨基酸同源性 Amino acid homology/%
<i>Larimichthys crocea</i> _GSDf	本实验室 ^[19]	63.4
<i>Dicentrarchus labrax</i> _GSDf	AGA54135.1	70.2
<i>Epinephelus akaara</i> _GSDf	AIW52566.1	67.6
<i>Paralichthys olivaceus</i> _GSDf	ARR75204.1	64.5
<i>Scophthalmus maximus</i> _GSDf	AJ067894.1	61.8
<i>Monopterus albus</i> _GSDf	ALG62631.1	60.8
<i>Oryzias latipes</i> _GSDf	NP_001171213.1	57.0
<i>Halichoeres trimaculatus</i> _GSDf	BAM75186.1	56.4
<i>Oreochromis mossambicus</i> _GSDf	ALO18792.1	54.0
<i>Danio rerio</i> _GSDf	AFI98392.1	31.1
<i>Oreochromis niloticus</i> _AMH	CDI30241.1	16.5
<i>Danio rerio</i> _AMH	AAT77729.2	12.6
<i>Oryzias latipes</i> _AMH	NP_001098198.1	11.1
<i>Oncorhynchus mykiss</i> _TGF	CAA67685.1	13.4
<i>Danio rerio</i> _TGF-β2	NP_919366.1	10.8
<i>Oryzias latipes</i> _BMP	NP_001098378.1	16.3
<i>Danio rerio</i> _BMP	BAA24406.1	16.1

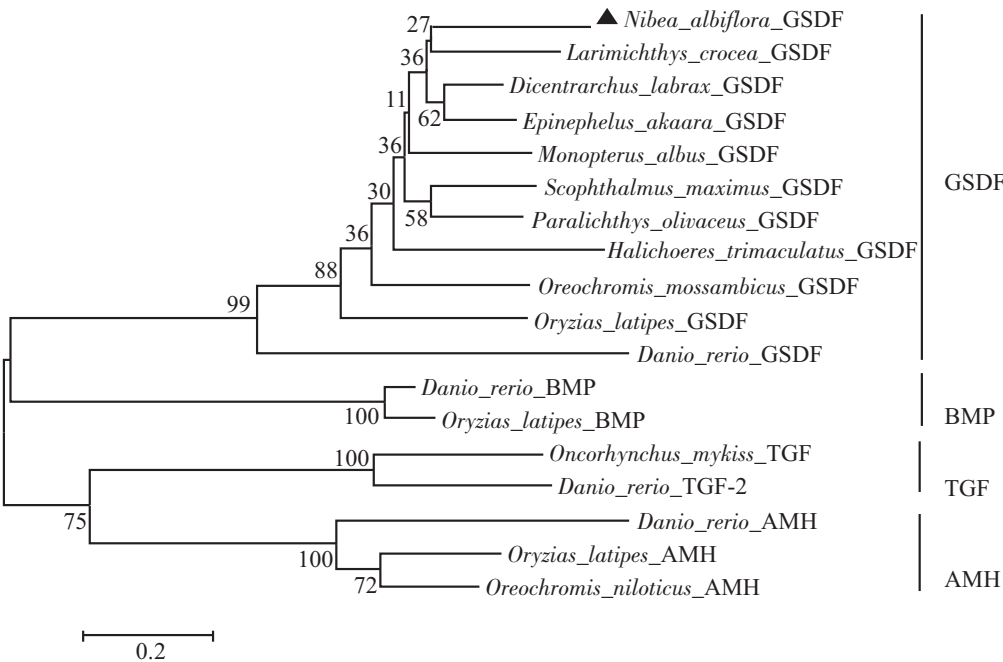


图 5 黄姑鱼 GSDf 与其他鱼类 GSDf 及 TGF-β 超家族其他成员的系统进化分析

Fig.5 Phylogenetic analysis of GSDf in *N. albiflora* and other fishes and other members of TGF-β superfamily

2.3 *gsdf* 基因在不同组织和不同发育阶段的表达分析

2.3.1 不同组织中的表达情况

以 β -actin 基因为内参, 利用实时荧光定量 PCR 检测黄姑鱼 *gsdf* 基因在性腺、心脏、肝脏、脾脏、肾、胃、脑、肌肉、眼和头肾共 10 个组织中的表达情况。结果如图 6 所示, 黄姑鱼 *gsdf* 基因主要集中在精巢中表达, 其表达量远远高于卵巢 ($P < 0.001$)。在雄鱼的心脏、脾脏、眼、胃中也有比较明显的表达, 但与精巢相比其表达量都很低, 其他组织中的表达量更低, 肝脏中完全没有检测到表达; 雌性黄姑鱼各组织中 *gsdf* 的表达量都很低, 除了在肌肉、胃和眼中的表达量与雄鱼相近外, 在肾脏、脑和卵巢中都只有痕量表达, 在心脏和脾脏中的表达量也显著低于雄性 ($P < 0.01$)。

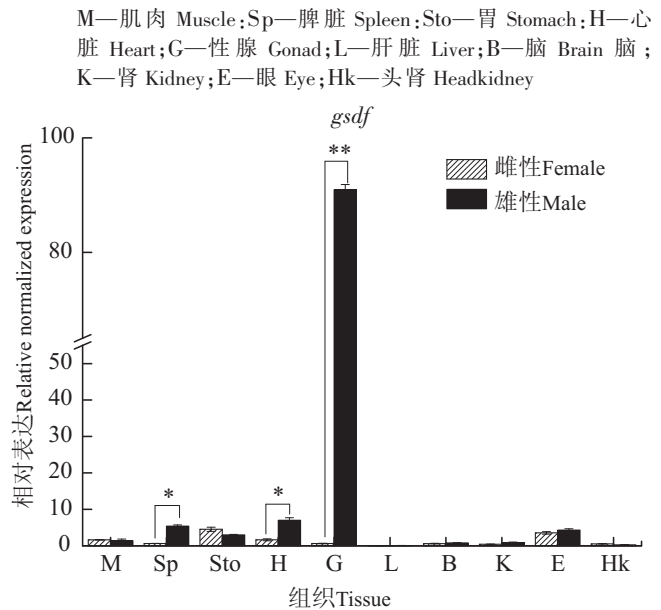
2.3.2 不同发育时期性腺中的表达情况

利用实时荧光定量 PCR 检测 *gsdf* 基因在黄姑鱼不同发育时期性腺中的表达量 (见图 7), 结果进一步显示了该基因在雄性精巢中高表达的性别特异性表达特征。其中 *gsdf* 基因从孵化后第 40 天在雄鱼性腺中开始表达, 第 49 天后表达量快速升高, 在孵化后第 120 天表达量达到高峰, 随后开始下降, 在第 180 天时的表达量只有第 120 天时的 35.3%, 到第 390 天时表达量只有第 120 天时的 8.3%, 之后到第 540 天表达量基本保持稳定。在整个发育过程中 *gsdf* 基因在卵巢中的表达量相对极低, 几乎检测不到其表达。

3 讨论

已有的研究表明, 控制脊椎动物性腺发育的基因及机制具有多变性和可塑性, 往往那些本不参与性别决定的基因可能通过基因复制或突变等途径跨越基因遗传的层级而被招募成为新的性别决定开关基因^[20], 导致在分类地位上相近、甚至同一个属不同物种的鱼类其性别决定的基因都可能不一样 (如 *O. latipes*^[21] 与 *O. luzonensis*^[22])。因此, 每一个参与性别决定分化及发育的基因都具有深入剖析和研究的意义。

本研究首次克隆了黄姑鱼 *gsdf* 基因, 序列比对和同源性分析的结果显示, 黄姑鱼 *gsdf* 基因具有 TGF- β 超家族保守功能结构域和 9 个保守的半胱氨酸残基, 提示这些半胱氨酸残基对于维持 TGF- β 超家族蛋白质的空间结构和行使其生理功能具有极其重要的作用。系统进化分析发现黄姑鱼 *gsdf* 基因同其他物种 *gsdf* 基因聚为一枝, 明显有别于 TGF- β 超家族的其他成员, 由此可以推测黄姑鱼 *gsdf*



说明:**表示雌雄性腺表达量差异极显著 ($P < 0.001$); *表示雌雄性腺表达量差异显著 ($P < 0.01$)。

Notes: ** represents highly significant difference ($P < 0.001$) between gonads. * represents significant difference ($P < 0.01$) between gonads.

图 6 黄姑鱼 *gsdf* 基因在各组织中的相对表达

Fig.6 Expression of *gsdf* in each tissues of *N. albiflora*

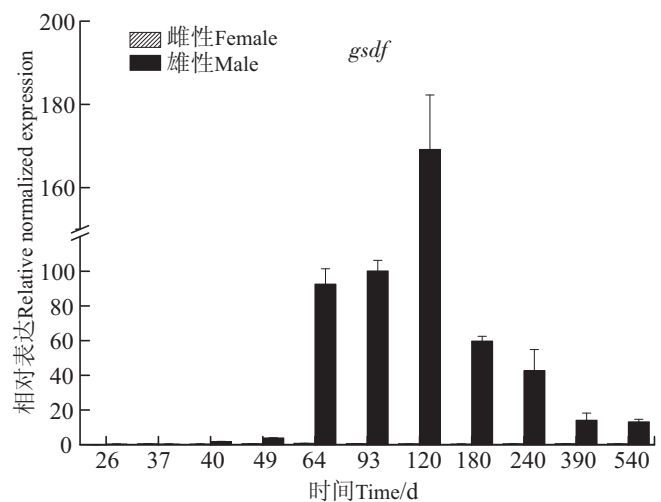


图 7 黄姑鱼 *gsdf* 基因在不同发育时期性腺中的相对表达

Fig.7 Expression of *gsdf* in *N. albiflora* gonad during different day post hatch

与其他物种的 *gsdf* 有着同样或相似的功能。有趣的是黄姑鱼与大黄鱼同属于石首鱼科,但其 *gsdf* 的氨基酸序列与大黄鱼的相似性却低于与鲈鱼、石斑鱼和牙鲆的相似性,这一方面说明分类地位很近的物种之间其基因和所编码的蛋白质氨基酸序列除了与功能密切相关的区域外,其余区域也可以有较大的变化和差异,另一方面是否也暗示黄姑鱼与大黄鱼的 *gsdf* 之间存在着具体功能上的差别,值得进行比较研究。

荧光定量 PCR 检测发现黄姑鱼 *gsdf* 基因在雄鱼精巢中表现为特异性高表达,除性腺外, *gsdf* 基因在心脏、脾脏、胃、眼和肌肉等其他器官/组织中也能检测到一定量的表达,雌鱼胃、眼、肌肉、心脏、脾脏等中也能检测到少量的表达。作为 TGF- β 超家族的一员,这个结果与 TGF- β 超家族的成员对于细胞增殖分化、胚胎发育等多方面都起着重要作用的研究结论相一致,另一方面也提示该基因不太可能是黄姑鱼性别决定的关键起始基因。

组织学研究结果表明孵化后第 36 天为黄姑鱼性别决定的关键时期,孵化后第 61 天在雄性黄姑鱼中可观察到无限性小叶组织的存在,标志着黄姑鱼雄性精巢开始分化^[23]。本研究发现黄姑鱼 *gsdf* 基因在精巢未分化,孵化后第 40 天在雄鱼性腺中开始有明显表达,孵化后第 49 天表达量迅速升高,到孵化后第 120 天表达量达到高峰,此时黄姑鱼精巢已分化完成,正处于其快速发育和精原细胞快速增殖的阶段。之后随着精巢发育成型, *gsdf* 基因的表达量显著下降,但在精巢发育成熟之后仍保持着一定的表达量。这些结果提示 *gsdf* 基因与黄姑鱼雄性性别分化与发育过程密切相关,同时对于维持精巢的继续发育也有重要作用,因为黄姑鱼生殖细胞是分批成熟,在整个生活史中性腺首次发育成熟后,仍然不断有新的生殖细胞生成与发育,但具体的作用机制,还有待今后深入研究。研究^[19]表明大黄鱼精巢的 *gsdf* 基因在孵化后第 41 天检测有明显表达,孵化后第 49 天表达量显著升高,孵化后第 123 天达到高峰,随后表达量逐渐下降,到精巢发育成熟后 *gsdf* 基因的表达量下降到只有第 123 天的 10% 左右,而在雌鱼性腺中的表达量远远低于雄鱼性腺。与大黄鱼不同的是,黄姑鱼雌鱼在整个性腺分化、发育与成熟过程中 *gsdf* 基因都几乎检测不到其表达,或只有极少量的表达,其表达的性别特异性比大黄鱼更加明显,这也显示出两种鱼之间的差异。关于什么是黄姑鱼性别决定的关键起始基因, *gsdf* 基因在黄姑鱼性别决定和分化中的角色和具体功能是什么,还需进一步研究阐明。本文为深入研究黄姑鱼性别决定、发育与分化的分子机制提供了有益的资料。

[参 考 文 献]

- [1] LONG J A. The rise of fishes : 500 million years of evolution [M]. Baltimore, Maryland, U. S. : Johns Hopkins University Press, 2011.
- [2] BONDURIANSKY R, CHENOWETH S F. Intralocus sexual conflict [J]. Trends in Ecology & Evolution, 2009, 24(5): 280-288.
- [3] WILLIAMS T M, CARROLL S B. Genetic and molecular insights into the development and evolution of sexual dimorphism [J]. Nature Reviews Genetics, 2009, 10(10): 797-804.
- [4] HERPIN A, SCHARTL M. Plasticity of gene-regulatory networks controlling sex determination: of masters, slaves, usual suspects, newcomers, and usurpators [J]. Embo Reports, 2015, 16(10): 1260-1274.
- [5] SINCLAIR A H, BERTA P, PALMER M S, et al. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif [J]. Nature, 1990, 346(6281): 240-244.
- [6] MATSUDA M, NAGAHAMA Y, AI S, 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.
- [7] MYOSHO T, OTAKE H, MASUYAMA H, et al. Tracing the emergence of a novel sex-determining gene in medaka, *Oryzias luzonensis* [J]. Genetics, 2012, 191(1): 163-170.
- [8] RONDEAU E B, MESSMER A M, DAN S S, et al. Genomics of sablefish (*Anoplopoma fimbria*): expressed genes, mitochondrial phylogeny, linkage map and identification of a putative sex gene [J]. BMC Genomics, 2013, 14(1): 452-470.

- [9] HATTORI R S, STRSSMANN C A. A Y-linked anti-Müllerian hormone duplication takes over a critical role in sex determination [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(8): 2955-2959.
- [10] KAMIYA T, KAI W, TASUMI S, et al. A trans-species missense SNP in Amhr2 is associated with sex determination in the tiger pufferfish, *Takifugu rubripes* (Fugu) [J]. Plos Genetics, 2012, 8(7): e1002798.
- [11] LI M, SUN Y, ZHAO J, et al. A tandem duplicate of anti-müllerian hormone with a missense SNP on the Y chromosome is essential for male sex determination in *Nile tilapia*, *Oreochromis niloticus* [J]. PLoS Genetics, 2015, 11(11): e1005678.
- [12] HAQQ C M, DONAHOE P K. Regulation of sexual dimorphism in mammals [J]. Physiological Reviews, 1998, 78(1): 1-33.
- [13] SAWATARI E, SHIKINA S, TAKEUCHI T, et al. A novel transforming growth factor-beta superfamily member expressed in gonadal somatic cells enhances primordial germ cell and spermatogonial proliferation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Developmental Biology, 2007, 301(1): 266-275.
- [14] SHIBATA Y, PAUL-PRASANTH B, SUZUKI A, et al. Expression of gonadal soma derived factor (gsdf) is spatially and temporally correlated with early testicular differentiation in medaka [J]. Gene Expression Patterns Gep, 2010, 10(6): 283-289.
- [15] JIANG D N, YANG H H, LI M H, et al. *gsdf* is a downstream gene of *dmrt1* that functions in the male sex determination pathway of the *Nile tilapia* [J]. Molecular Reproduction & Development, 2016, 83(6): 497-508.
- [16] 朱元鼎. 中国石首鱼类分类系统的研究和新属新种的叙述 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1963.
- [17] 徐冬冬, 詹炜, 楼宝, 等. 网箱养殖黄姑鱼生长特性初步研究 [J]. 渔业现代化, 2010, 37(5): 34-36.
- [18] 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, DOI:10.1016/j.aquaculture.2018.03.042.
- [19] 林爱强, 谢仰杰, 徐双斌, 等. 大黄鱼 *gsdf* 和 *amh* 基因的克隆及表达分析 [J]. 南方水产科学, 2017, 13(6): 1-13.
- [20] SCHARTL M. Sex chromosome evolution in non-mammalian vertebrates [J]. Current Opinion in Genetics & Development, 2004, 14(6): 634-641.
- [21] 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.
- [22] MYOSHO T, OTAKE H, MASUYAMA H, et al. Tracing the emergence of a novel sex-determining gene in medaka, *Oryzias luzonensis* [J]. Genetics, 2012, 191(1): 163-170.
- [23] LOU B, XU D, GENG Z, et al. Histological characterization of gonadal sex differentiation in *Nibea albiflora* [J]. Aquaculture Research, 2016, 47(2): 632-639.

(责任编辑 朱雪莲 英文审校 黄力行)