

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2009.00088

半滑舌鳎雌性特异 AFLP 标记 CseF783 的克隆及其在遗传性别鉴定中的应用

马洪雨^{1,2}, 陈松林¹, 李静¹, 田永胜¹, 季相山¹, 张立敬¹

1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 青岛 266071;

2. 中国海洋大学海洋生命学院, 青岛 266003

摘要: 半滑舌鳎性别控制和全雌育种等研究领域迫切需要一种能够快速鉴定鱼类个体遗传性别的有效方法。

文章采用 AFLP 技术, 利用选择性引物组合(E-ACT/M-CAA)从半滑舌鳎中筛选到一条雌性特异的 AFLP 标记。对该标记进行二次 PCR 扩增、琼脂糖凝胶回收、克隆、测序。分析表明, 序列全长为 791 bp, 与 GenBank 中的序列无同源性。以该雌性特异 AFLP 标记 DNA 序列为模板, 设计了一对特异的 PCR 引物, 成功地将其转化为 SCAR(Sequence characterized amplified regions)标记, 并在 100 尾已知性别的半滑舌鳎个体(雌雄各 50 尾)中进行验证, 结果表明, 该 SCAR 标记在所有雌性个体中均扩增得到一条长度为 324 bp 的 DNA 条带, 而在 49 尾雄性个体中均扩增不到该 DNA 条带(有 1 尾雄性个体例外), 证明该 SCAR 标记是雌性特异的, 并可用于半滑舌鳎个体遗传性别鉴定。随后, 利用该 SCAR 标记检测了 3 日龄半滑舌鳎幼苗, 结果表明, 雌性个体比例为 41.7%。

关键词: 半滑舌鳎; 雌性特异 AFLP 标记; SCAR 标记; 遗传性别; 鉴定

Development of female-specific AFLP marker CseF783 and its application in genetic sex identification in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)

MA Hong-Yu^{1,2}, CHEN Song-Lin¹, LI Jing¹, TIAN Yong-Sheng¹, JI Xiang-Shan¹, ZHANG Li-Jing¹

1. Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China

Abstract: Molecular sex identification is important in studying sex control, sex determination, and all-female breeding in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). In the present study, a female-specific AFLP marker was isolated from *Cynoglossus semilaevis* by AFLP technique using the selective primer combination E-ACT/M-CAA. This marker was re-amplified, recovered from the agarose gels, cloned and sequenced. Bioinformatic analysis indicated that the length of the product was 791 bp, and the sequence showed no similarity to any known sequences deposited in the GenBank database using BLASTn. According to the DNA sequence of the female-specific AFLP marker, specific PCR primers were designed and PCR amplification was performed on 100 sex-known individuals of *C. semilaevis* (50 females and 50 males each). A

收稿日期: 2008-05-04; 修回日期: 2008-11-06

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目(863 计划)(编号: 2006AA10A403)、山东省良种工程重大项目及山东省泰山学者建设工程项目资助

作者简介: 马洪雨(1979-), 男, 博士, 研究方向: 水产生物技术与分子生物学。E-mail: mhyxl@163.com

通讯作者: 陈松林(1960-), 男, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 水产生物技术。E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

specific band 324 bp in length was present in all females but absent in all males (except for one male), indicating that the female-specific AFLP marker was successfully converted into female-specific SCAR (sequence characterized amplified regions) marker. The sex analysis of 3-day-old *C. semilaevis* individuals using this female-specific SCAR marker indicated that the female ratio was 41.7%. The female-specific SCAR marker developed in this study allowed simple, reliable, and rapid molecular sex identification using small amounts of fin tissue without sacrifice of *C. semilaevis* especially at early stage of development.

Keywords: half-smooth tongue sole; *Cynoglossus semilaevis*; female-specific AFLP marker; SCAR marker; genetic sex; identification

半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*) 是一种珍稀名贵的温水性大型底层比目鱼类, 属鲽形目(Pleuronectiformes)、舌鲷科(Pleuronectiformes)、舌鲷属(*Cynoglossus*), 主要生活于我国的黄渤海海域^[1]。目前, 鲽形目鱼类已经成为我国北方海水养殖业的主导, 主要包括大菱鲆、牙鲆、星鲽、半滑舌鲷等。半滑舌鲷在我国已报道的 25 种舌鲷属种类中个体最大, 生长速度快, 肉味鲜美, 市场价值高, 因此极具开发价值。我国对半滑舌鲷的研究始于 20 世纪 80 年代后期^[2], 2002~2003 年首次完成了半滑舌鲷生殖调控及规模化人工繁育技术研究, 达到工业化生产商业苗种的水平。目前, 有关半滑舌鲷的研究报道主要涉及以下几个领域: 生长与繁殖^[3~6]、细胞生物学如染色体核型^[7,8]、群体遗传学^[9,10]等。研究表明, 半滑舌鲷雌雄个体差异显著, 性成熟雌鱼平均体长是同期雄鱼的两倍左右, 且卵巢发达, 精巢细小, 导致自然种群不繁盛^[11]。因此, 研究其雌雄发育差异、培育全雌苗种必将大大提高养殖产量, 促进水产养殖业的发展。近几年来, 本实验室在半滑舌鲷性别相关基因、分子标记、性别控制及雌核发育等方面做了一系列的研究工作^[12~16], 获得了遗传上为雌性而表型上为雄性的性逆转“伪雄鱼”。对于性逆转的“伪雄鱼”的表型性别可通过性腺组织切片法及待其性成熟后看其产卵子或精子的方法进行, 但前者需要杀死鱼类, 而后者所需等待的时间较长, 且二者均无法准确鉴定其遗传性别。遗传性别的鉴定可通过其 F_1 代的性别比例来鉴定, 但这所需时间更长, 严重阻碍了半滑舌鲷及其他鱼类育种工作的进行。如何快速有效地鉴定个体的性别, 成为制约半滑舌鲷性别控制及全雌育种, 从而提高养殖产量的关键因素。

已有利用雌雄鱼类基因组 DNA 水平上的差异

鉴定其性别的研究报道^[17,18], 并且以利用这种方法辅助建立了大鳞大麻哈鱼的全雌群体^[19]。本文在前人对半滑舌鲷性别相关分子标记筛选的基础上^[12], 利用基因克隆技术克隆了一个半滑舌鲷雌性特异的 AFLP 标记, 成功地将其转化为廉价且易操作的 SCAR 标记, 并建立了遗传性别鉴定的 PCR 方法, 以期半滑舌鲷性别控制及全雌育种提供可靠、快捷的分子性别鉴定手段, 促进我国半滑舌鲷遗传育种及养殖工作的顺利进行。

1 材料和方法

1.1 材料

试验鱼全部取于山东海阳实验基地。用于验证雌性特异 SCAR 标记的 100 尾正常半滑舌鲷分批活体运回实验室; 3 日龄鱼苗于 2007 年 10 月经人工授精产生, 随机取样 36 尾活体带回实验室。

1.2 方法

1.2.1 性腺组织切片

用于验证雌性特异 SCAR 标记的 100 尾正常半滑舌鲷个体的性腺组织摘取后固定于固定液中, 根据其性腺的特征初步鉴定个体性别, 并进一步通过性腺组织的脱水、包埋、切片、染色、脱色及显微观察技术鉴定每个个体的性别。

1.2.2 基因组 DNA 提取

3 日龄鱼苗采用全鱼提取 DNA, 其他实验鱼采用少量鳍条组织提取 DNA。提取方法详见参考文献^[12]。用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳和核酸测定仪检测基因组 DNA 的质量和浓度, 并将 DNA 的浓度稀释为 100 ng/ μ L, -20°C 保存。

1.2.3 AFLP 分析

AFLP 分析过程参照参考文献[12], 稍作修改。首先, 利用 1 μL 的 *EcoR* 和 *Mse* (1.25 U/ μL , Li-Cor, USA) 内切酶混合物酶切约 100 ng 的基因组 DNA, 37 $^{\circ}\text{C}$ 酶切 6 h; 然后 70 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 min。酶切产物与接头在 20 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中连接约 20 h。以 10 倍稀释的连接产物为模板进行预扩增, 预扩增引物的 3' 末端加 1 个选择性碱基, 其序列分别为 *EcoR* +A (5'-GACTGCGTACCAATTC+A-3') 和 *Mse* +C (5'-GATGAGTCCTGAGTAA+C-3')。最后, 以 45 倍稀释的预扩增产物为模板进行选择扩增, 选择性扩增引物的 3' 末端在预扩增引物的基础上再加 2 个选择性碱基(E-ACT/M-CAA)。选择性扩增产物用 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行检测。

1.2.4 雌性特异标记的克隆和序列分析

利用手术刀从 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶上将目的条带割下, 加 30 μL 的 TE Buffer, 于 55 $^{\circ}\text{C}$ 水浴消化约 1 h。然后 12 000 r/min 离心 5 min, 吸上清作为二次 PCR 扩增的模板。二次 PCR 扩增产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶上电泳, 并进行回收、克隆、测序。利用 BLASTn 方法 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 搜索该雌性特异标记在 GenBank 数据库中的同源序列。利用 Sequin Application Version 6.25 软件将雌性特异标记序列提交到 GenBank 数据库中。

1.2.5 SCAR 标记转化及 PCR 反应体系的建立

根据雌性特异的 AFLP 标记 DNA 序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计了一对特异的 PCR 引物, 其序列为: F: 5'-TGTTCTTGCTCTCGCTCCCT-3', R:

5'-AGGTGTAACCATCAACTTTTTC-3'。PCR 反应体系为: DNA 模板 100 ng; 上下游引物终浓度为 0.4 $\mu\text{mol/L}$; Mg^{2+} 终浓度为 1.5 mmol/L; dNTP 终浓度为 0.2 mmol/L; *Taq* DNA 聚合酶 0.75 U; 1 \times PCR buffer; 补充灭菌双蒸水至终体积 25 μL 。PCR 反应在 Peltier Thermal Cycler (PTC-200) 上进行。反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 复性 50 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 50 s, 30 个循环; 最后再 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶进行检测, 凝胶成像系统拍照。

2 结果与分析

2.1 性腺组织切片观察结果

从 100 尾半滑舌鲷个体中分别摘取性腺, 并使用固定液固定。首先根据性腺的形态初步鉴定其雌雄, 进一步利用组织切片及显微观察技术鉴定每尾个体的性别。结果显示, 50 尾个体的性腺中含有卵母细胞, 而另外 50 尾个体性腺中含有精母细胞 (图 1)。这表明在 100 尾半滑舌鲷个体中, 50 尾个体为雌性, 其余 50 尾个体为雄性。

2.2 AFLP 筛选结果

根据 Chen 等[12]的研究报道, 利用 AFLP 选择性引物组合 E-ACT/M-CAA 对半滑舌鲷 20 尾雌性个体和 20 尾雄性个体进行全基因组扫描。结果表明, 限制性扩增条带大小位于 50~800 bp 之间, 多态性条带比例较高。在所有的雌性个体中均出现一条分子量为 780 bp 左右的特异条带, 而在所有雄性个体中均不出现该条带。

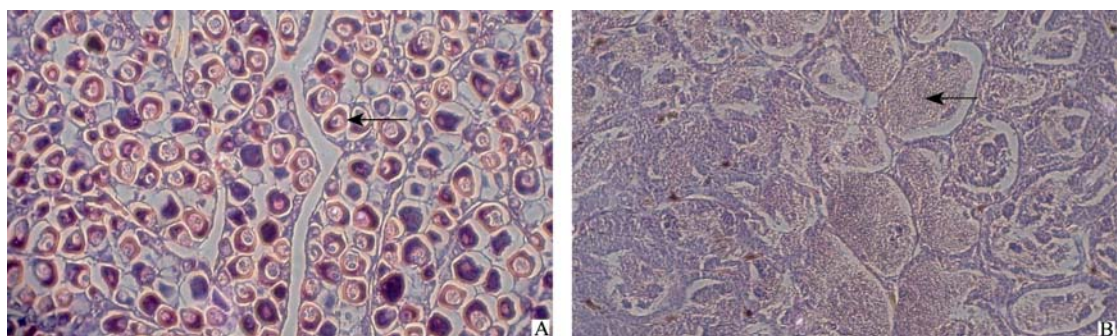


图 1 半滑舌鲷部分雌性个体(A)及雄性个体(B)的性腺组织切片
黑色箭头指示卵母细胞, 白色箭头指示精母细胞。

2.3 雌性特异 AFLP 标记的克隆和序列分析

对该雌性特异的 AFLP 标记进行二次 PCR 扩增、琼脂糖凝胶回收、克隆和测序。结果表明, 该序列的核苷酸长度为 791 bp, G+C 含量分别为 44% (图 2)。利用 DNAMAN Version 4.0 软件对 5 个不同个体多个克隆子的序列进行比对, 结果表明它们均为同一个序列。利用 BLASTn 软件在 GenBank 数据库中对该序列进行同源性搜索, 结果表明无同源序列存在, 说明这个序列为半滑舌鲷的新序列。该雌性特异标记序列已经提交到 GenBank 数据库中(登录号: EU430413)。

2.4 雌性特异 AFLP 标记向 SCAR 标记的转化及验证

根据半滑舌鲷雌性特异的 AFLP 标记 DNA 序列(图 2), 设计了一对特异的 PCR 引物, 将其转化为简单、易操作的 SCAR 标记。验证结果表明, 通过优化 PCR 条件, 在全部 50 尾雌性个体中均能扩增到一条特异的、大小为 324 bp 的 DNA 条带, 而在 49 尾雄性个体中均无该目的条带(有 1 尾个体除外)(图 3)。表明已成功地将半滑舌鲷雌性特异的 AFLP 标记转化为 SCAR 标记, 且该 SCAR 标记是雌性特异的, 可方便的用于半滑舌鲷个体的性别鉴定。

2.5 雌性特异 SCAR 标记在 3 日龄半滑舌鲷鱼苗中的性别鉴定结果

半滑舌鲷增养殖及育种过程中通常需要鉴定其性别, 特别是在发育的早期进行性别鉴定, 可大大提高养殖产量, 缩短育种时间, 提高育种效率。本文利用雌性特异的 SCAR 标记鉴定了经人工授精产生的三日龄鱼苗的性别。结果在 36 尾正常半滑舌鲷鱼苗中雌鱼有 15 尾, 雄鱼有 21 尾, 雌雄比例接近 1 : 1(图 4), 表明该方法完全适用于发育早期的半滑舌鲷性别鉴定。

3 讨论

鱼类性别的分子鉴定方法(特别是在发育的早期)已经在水产养殖及遗传育种等领域发挥了越来越重要的作用。海水养殖中的比目鱼类普遍存在如生长速度、体重、体长等雌性大于雄性的现象, 因此进行鱼类性别控制及培育全雌苗种已成为科学研究及养殖业中提高产量、节约成本的备受关注的领

域。近年, 国家“863”项目列专项重点资助对重要海水养殖鱼类的性别控制的研究, 目前, 该研究已取得了可喜的成果。由于鱼类雌雄个体外表差异较小, 仅从外表特别是在发育的早期难以辨别其雌雄。因此, 研究雌雄鱼基因组水平的差异, 寻找能够区分雌雄鱼的分子标记, 已成为科学研究及渔业生产中的热点。AFLP 技术已经被广泛地应用于各种生物的遗传学研究工作中^[20,21], 但与普通的 PCR 技术相比, 具有操作步骤繁琐、实验周期长、对基因组 DNA 质量要求高、花费大等缺点。因此, 对性别特异的 AFLP 标记进行克隆、测序, 并将其转化为应用简单的 SCAR 标记是非常必要的。本文利用 AFLP 技术筛选得到一个半滑舌鲷雌性特异的 AFLP 标记, 根据其 DNA 序列(图 2)设计了特异的 PCR 引物, 将其转化为 SCAR 标记, 并利用 100 尾已通过性腺组织切片确定性别的半滑舌鲷个体(雌雄各 50 尾)检测了该 SCAR 标记的可用性。结果在所有 50 尾雌鱼中均扩增到一条特异的、大小为 324 bp 的 DNA 条带, 而在 49 尾雄鱼中扩增不到此目的条带, 这表明该 SCAR 标记是半滑舌鲷雌性特异的, 可方便地用于半滑舌鲷个体性别的鉴定工作中。

鱼类的性别决定机制与哺乳类不同, 其性别分化的可塑性很强, 由于鱼类的性染色体大多处于未分化状态或分化的早期阶段^[22], 因此在某些鱼类, 除性染色体之外, 常染色体上的某些基因位点也可能参与性别决定, 此外, 环境因素如: 温度、pH 值等对性别分化也有一定影响^[23~26]。据报道, 在已研究过的鱼类中, 只有大约 10% 的鱼类具有性染色体^[23], 且雌雄性染色体之间的差异比哺乳类要低得多。在 Atlantic salmon (*Salmo salar*)和 green spotted pufferfish (*Tetraodon nigroviridis*)两种鱼类中未发现雌雄间基因组 DNA 上的差异^[27,28]。半滑舌鲷的性别决定机制为 ZZ/ZW 型, Zhuang 等^[7]对其进行细胞学研究时发现其雌雄性染色体差异较大; 而 Chen 等^[12]应用 AFLP 技术, 利用 64 对选择性引物组合对半滑舌鲷基因组进行扫描, 筛选到 7 个雌性特异标记; 邓思平等^[15]利用温度处理方法获得了半滑舌鲷性逆转的“伪雄鱼”。本研究成功获得了半滑舌鲷雌性特异的 SCAR 标记, 利用这个标记能够快速、简便地鉴定半滑舌鲷个体性别。50 尾雄鱼中有 1 尾扩增到了预期目的片段, 表明这 1 尾雄鱼在遗传上很可能是雌性的, 有可能经历了自然的性逆转过程, 由遗

传上的雌性逆转为表型上的雄性,但也不排除性染色体之间存在重组的可能性。

利用 PCR 鉴定性别的方法在绵羊^[29]、毛冠鹿^[30]

等哺乳动物中已有报道。在鱼类中,学者们也已经获得了性别相关基因^[31]及性别特异的 DNA 标记,如:青鳉^[32]、非洲鲶鱼^[33]、虹鳟^[34]等。这些性别相

CseF783-1	<u>GACTGCGTACCAATTC</u> ACTGTCTGATGACACAGGATACGCTGCACGCAGTTTAGAGTGC	60
CseF783-2	-----	60
CseF783-3	-----	60
CseF783-4	-----	60
CseF783-1	TGGACCGTAGACATGCCAACTACACTTCAAATTGTGAATGAGGTTTCCAGGTAAATGCA	120
CseF783-2	-----	120
CseF783-3	-----	120
CseF783-4	-----c-----	120
CseF783-1	CAGTTCCTTTCAAAGCTGGTGAAGGCTACAATAGGTCTGATCATATGAGAAAGCTTGTCGAG	180
CseF783-2	-----	180
CseF783-3	-----	180
CseF783-4	-----t-----	180
CseF783-1	AAAATAGTAGCAGAGATTTCGAGCATGACGGTGACACAGAGTGGGGAGAGGAGGTGACTGT	240
CseF783-2	-----	240
CseF783-3	-----	240
CseF783-4	-----a-----	240
CseF783-1	TCCGATCAATGACATTTTGTGCGGTTCGGCCACAGAAATGTCTATTGACCTGGACAAAA	300
CseF783-2	-----	300
CseF783-3	-----	300
CseF783-4	-----c-----	300
CseF783-1	GGAAGCTGTTCTTGTCTTCGCTCCCTGGCTTTGATACAACCTCTGCTCCAACCAAACACAG	360
CseF783-2	-----	360
CseF783-3	-----	360
CseF783-4	-----	360
CseF783-1	CAGTGTGAGCCATGTATTCTGTTGTTTTACTCTGAGTTCACTGTTGCGTACTCACAGAA	420
CseF783-2	-----	420
CseF783-3	-----	420
CseF783-4	-----c-----g-----	420
CseF783-1	TGCAATTTGCTCCTCTGTCCAAAATCTGGTCTTCCCTATTGTGTTATAACTAAATAAATA	480
CseF783-2	-----	480
CseF783-3	-----	480
CseF783-4	-----	480
CseF783-1	ACTAATAACTCATAAATAAATTATAACTAATCAACATAACATTATGGTTGCAGCAGTGAT	540
CseF783-2	-----	540
CseF783-3	-----	540
CseF783-4	-----	540
CseF783-1	GTGTTCTGATTATGCAGTGAGCCCTTTACATTCAACATCACTGAGGGGTGACATGTAGCA	600
CseF783-2	-----	600
CseF783-3	-----	600
CseF783-4	-----t-----	600
CseF783-1	CGACACACGAAAAAGTTGATGGTTACACCTGCAAAACACATTACGTAAAAATGAAGCACTT	660
CseF783-2	-----	660
CseF783-3	-----	660
CseF783-4	-----g-----	660
CseF783-1	ATTCTGTGACACAAAAGTGTTCGGTGTACATACTAAATCATGGTGTAATTATCAGGTGC	720
CseF783-2	-----	720
CseF783-3	-----	720
CseF783-4	-----c-----	720
CseF783-1	ACCATTTTCCTCTCCTCTCACAGGCACACACATCCCACTAAGTGCCACAGACTTGTTACT	780
CseF783-2	-----	780
CseF783-3	-----	780
CseF783-4	-----	780
CseF783-1	<u>CAGGACTCATC</u>	791
CseF783-2	-----	791
CseF783-3	-----	791
CseF783-4	-----	791

图 2 半滑舌鲷雌性特异的 AFLP 标记 CseF783 的 DNA 序列

双下划线“=”代表 AFLP 选择性引物结合区;单下划线“-”代表 SCAR 引物结合区。

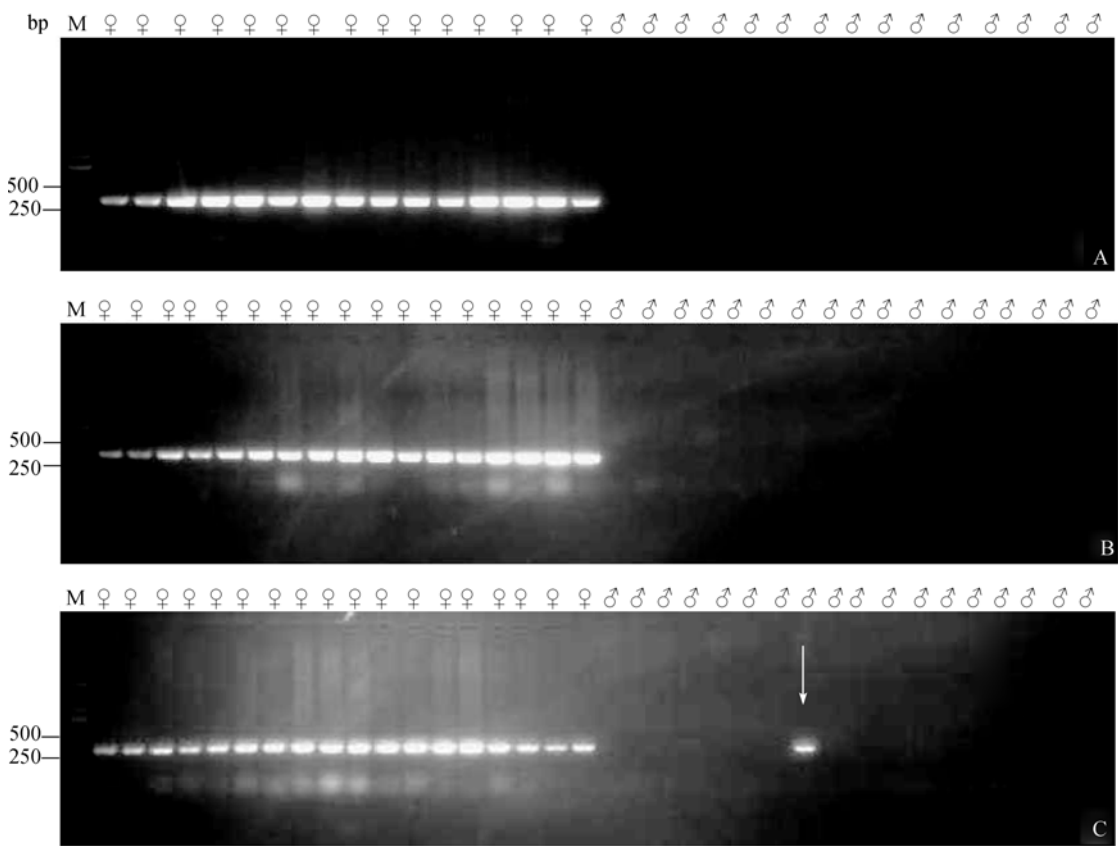


图 3 雌性特异的 SCAR 标记在 100 尾半滑舌鲷个体中的检测结果
A: 表示第 1~15 尾雌鱼和雄鱼; B: 表示第 16~32 尾雌鱼和雄鱼; C: 表示第 33~50 尾雌鱼和雄鱼。白色箭头表示出现目的条带的伪雄鱼; M: DL2000 分子量标准。



图 4 雌性特异的 SCAR 标记在 3 日龄半滑舌鲷鱼苗中的扩增结果
M: DL2000 分子量标准; 1~36: 表示 36 尾 3 日龄半滑舌鲷鱼苗; 黑色箭头表示目的条带, 白色箭头表示无目的条带。

关基因及性别特异标记的发现, 对于研究鱼类性别决定及早期分化过程中起重要作用的相关基因具有重要的指导意义。由于许多鱼类存在雌雄生长速度差异较大的现象, 如: 罗非鱼雄性比雌性生长速度快约 40% 以上, 而鲤鱼、牙鲆、半滑舌鲷等鱼类雌性比雄性生长速度快约 30%~100%^[35]。因此, 对这些鱼类进行雄核或雌核发育及性逆转研究, 培育单性群体, 必将会提高养殖产量, 节约养殖成本。分子性别鉴定方法可以在鱼类发育过程的早期进行, 而

不需要等到其后代性成熟, 甚至可以利用受精后几小时的胚胎进行性别鉴定, 从而估计群体的性别比例, 促进相关工作的顺利进行。

参考文献(References):

[1] 李思忠, 王惠民. 中国动物志: 硬骨鱼纲鲷形目. 北京: 科学出版社, 1995, 334~366.
[2] 雷霖霖. 海水鱼类养殖理论与技术. 北京: 中国农业出版社, 2005: 647~665.
[3] 马爱军, 柳学周, 徐永江, 梁友, 庄志猛, 翟介明, 李波.

- 半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)早期发育阶段的摄食特性及生长研究. 海洋与湖沼, 2005, 36(2): 130–138.
- [4] 杜伟, 蒙子宁, 薛志勇, 姜言伟, 庄志猛, 万瑞景. 半滑舌鲷胚胎发育及其与水温的关系. 中国水产科学, 2004, 11(1): 48–53.
- [5] 万瑞景, 姜言伟, 庄志猛. 半滑舌鲷早期形态及发育特征. 动物学报, 2004, 50(1): 91–102.
- [6] Dou SZ. Life history cycles of flatfish species in the Bohai sea, China. *Netherlands J Sea Res*, 1995, 34(1-3): 195–210.
- [7] Zhuang ZM, Wu D, Zhang SC, Pang QX, Wang CL, Wan RJ. G-banding patterns of the chromosomes of tonguefish *Cynoglossus semilaevis* Gunther, 1873. *J Appl Ichthyol*, 2006, 22(5): 437–440. [\[DOI\]](#)
- [8] 周丽青, 杨爱国, 柳学周, 杜伟, 庄志猛. 半滑舌鲷染色体核型分析. 水产学报, 2005, 29(3): 417–419.
- [9] 韩志强, 庄志猛, 高天翔, 刘进贤, 李玉晖, 王志勇, 唐启升. 半滑舌鲷 DNA 的群体遗传变异. 中国水产科学, 2007, 14(2): 192–200.
- [10] 庄志猛, 韩志强, 马爱军, 柳学周, 高天翔. 黄、渤海半滑舌鲷种群遗传结构的同工酶分析. 海洋水产研究, 2006, 27(2): 10–16.
- [11] 姜言伟, 万瑞景. 渤海半滑舌鲷的生殖习性及其产卵生态的研究. 海洋水产研究, 1988, 9: 185–192.
- [12] Chen SL, Li J, Deng SP, Tian YS, Wang QY, Zhuang ZM, Sha ZX, Xu JY. Isolation of female-specific AFLP markers and molecular identification of genetic sex in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Marine Biotechnol*, 2007, 9(2): 273–280. [\[DOI\]](#)
- [13] Chen SL, Tian YS, Yang JF, Shao CW, Ji XS, Zhai JM, Liao XL, Zhuang ZM, Su PZ, Xu JY, Sha ZX, Wu PF, Wang N. Artificial gynogenesis and sex determination in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Marine Biotechnol*, 2008, online available: 10.1007/s10126-008-9139-0.
- [14] Liao XL, Shao CW, Tian YS, Chen SL. Polymorphic dinucleotide microsatellites in tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Mol Ecol Notes*, 2007, 7(6): 1147–1149. [\[DOI\]](#)
- [15] 邓思平, 陈松林, 田永胜, 刘本伟, 庄志猛, 王清印, 邓寒. 半滑舌鲷的性腺分化和温度对性别决定的影响. 中国水产科学, 2007, 14(5): 714–719.
- [16] 邓思平, 陈松林, 刘本伟, 徐建勇, 田永胜, 邓寒. 半滑舌鲷脑芳香化酶基因 cDNA 克隆及表达分析. 动物学研究, 2008, 29(1): 17–24.
- [17] Coughlan T, Scharlt M, Hornung U, Hope I, Stewart A. PCR-based sex test for *Xiphophorus maculatus*. *J Fish Biol*, 1999, 54(1): 218–222. [\[DOI\]](#)
- [18] Devlin RH, Mcneil BK, Groves TDD, Donaldson EM. Isolation of a Y-chromosomal DNA probe capable of determining genetic sex in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Can J Fish Aquat Sci*, 1991, 48(9): 1606–1612.
- [19] Devlin RH, Mcneil BK, Solar II, Donaldson EM. A rapid PCR-based test for Y-chromosomal DNA allows simple production of all-female strains of chinook salmon. *Aquaculture*, 1994, 128(3-4): 211–220. [\[DOI\]](#)
- [20] Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl Acids Res*, 1995, 23(21): 4407–4414. [\[DOI\]](#)
- [21] 马洪雨, 陈松林, 田永胜, 季相山. 我国引进条斑星鲷群体遗传多样性的 AFLP 分析. 水产学报, 2008, 32(3): 321–326.
- [22] Majumdar KC, Mcandrew BJ. Relative DNA content of somatic nuclei and chromosomal studies in three genera: *Tilapia*, *Sarotherodon* and *Oreochromis* of the tribe Tilapiini. *Genetica*, 1986, 68(3): 175–188. [\[DOI\]](#)
- [23] Devlin RH, Nagahama Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, 2002, 208 (3-4): 191–364. [\[DOI\]](#)
- [24] Desprez D, Melard C. Effect of ambient water temperature on sex determinism in the blue tilapia *Oreochromis aureus*. *Aquaculture*, 1998, 162(1-2): 79–84. [\[DOI\]](#)
- [25] Abucay JS, Mair GC, Skibinski DOF, Beardmore JA. Environmental sex determination: the effect of temperature and salinity on sex ratio in *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture*, 1999, 173(1-4): 219–234. [\[DOI\]](#)
- [26] Goto R, Tatsunari M, Kawamata K, Matsubara T, Mizuno S, Adachi S, Yamauchi K. Effects of temperature on gonadal sex determination in barfin flounder (*Verasper moseri*). *Fisheries Sci*, 1999, 65(6): 884–887.
- [27] McGowan C, Davidson WS. The RAPD technique fails to detect a male-specific genetic marker in Atlantic salmon *Salmo salar*. *J Fish Biol*, 1998, 53(5): 1134–1136. [\[DOI\]](#)
- [28] Li Y, Hill JA, Yue GH, Orban L. Extensive search does not identify genomic sex markers in *Tetraodon nigroviridis*. *J Fish Biol*, 2002, 61(5): 1314–1317. [\[DOI\]](#)
- [29] 张秀华, 吴登俊. 利用 SRY 基因和微卫星标记鉴定反刍动物性别. 遗传, 2006, 28(2): 133–139.
- [30] 蒋华云, 曹祥荣, 张锡然, 胡均, 徐春茂. 毛冠鹿 ZFY/ZFX 基因片段的克隆与性别鉴定. 遗传, 2004, 26(4): 465–468.
- [31] Cao JL, Cao ZM, Wu TT. Generation of antibodies against DMRT1 and DMRT4 of *Oreochromis aurea* and analysis of their expression profile in *Oreochromis aurea* tissues. *J Genet Genomics*, 2007, 34(6): 497–509. [\[DOI\]](#)
- [32] Matsuda M, Kusama T, Oshiro T, Kurihara Y, Hamaguchi S, Sakaizumi M. Isolation of a sex chromosome-specific DNA sequence in the medaka, *Oryzias latipes*. *Genes Genet Syst*, 1997, 72(5): 263–268. [\[DOI\]](#)
- [33] Kovacs B, Egedi S, Bartfai R, Orban L. Male-specific DNA markers from African catfish (*Clarias gariepinus*). *Genetica*, 2001, 110(3): 267–276. [\[DOI\]](#)
- [34] Felip A, Young WP, Wheeler PA, Thorgaard, GH. An AFLP-based approach for the identification of sex-linked markers in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 2005, 247(1-4): 35–43. [\[DOI\]](#)
- [35] 李静, 陈松林, 温海深. 鱼类性别相关基因及性别特异标记的研究进展. 海洋水产研究, 2006, 27(4): 90–95.