

doi: 10.3969/j.issn.2095-0780.2017.06.001

大黄鱼 *gsdf* 和 *amh* 基因的克隆及表达分析

林爱强, 谢仰杰, 徐双斌, 叶坤, 龚诗琦, 王志勇
(集美大学水产学院, 农业部东海海水健康养殖重点实验室, 福建 厦门 361021)

摘要: 该研究克隆了大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) *gsdf* (gonadal soma derived factor) 和 *amh* (anti-Müllerian hormone) 基因的开放阅读框序列并对它们的表达进行分析。大黄鱼 *gsdf* 基因 cDNA 序列开放阅读框长为 618 bp, 可编码 205 个氨基酸, 含有信号肽和 TGF- β 结构域。系统进化分析显示, 大黄鱼 *Gsdf* 与其他鱼类 *Gsdf* 聚为一枝, 而与 TGF- β 超家族其他成员分开。*Amh* 基因 cDNA 序列开放阅读框为 1 563 bp, 可编码 520 个氨基酸, 含有信号肽、AMH-N 区域和 TGF- β 保守结构域。系统进化分析显示, 大黄鱼 *Amh* 与舌齿鲈 (*Dicentrarchus labrax*) *Amh* 进化关系最近。荧光定量 PCR 表达分析显示, *gsdf* 和 *amh* 基因主要在大黄鱼性腺表达, 在精巢中的表达量显著高于卵巢 ($P < 0.05$), 2 个基因都在性腺分化前开始表达, 在雄鱼精巢中表达量呈现先升高后下降的趋势, 在卵巢的表达量很低。此外, 相比于正常雌鱼, *gsdf* 和 *amh* 基因在伪雄鱼 (遗传性雌鱼) 性腺中的表达量显著上调。这些结果表明, *gsdf* 和 *amh* 基因在大黄鱼性腺分化过程中起到重要的作用。

关键词: 大黄鱼; *gsdf* 基因; *amh* 基因; 基因表达; 性腺分化; 荧光定量 PCR

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

文章编号: 2095-0780-(2017)06-0001-13

Cloning and expression profiling of *gsdf* and *amh* genes in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)

LIN Aiqiang, XIE Yangjie, XU Shuangbin, YE Kun, GONG Shiqi, WANG Zhiyong
(Key Lab. of Healthy Mariculture for East China Sea, Ministry of Agriculture; Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: In this study, the gonadal soma derived factor (*gsdf*) and anti-Müllerian hormone (*amh*) were cloned from *Larimichthys crocea*, and their expression patterns were analysed by qRT-PCR. The results shows that the open reading frame (ORF) of *gsdf* gene spanned a region of 618 bp and coded 205 amino acids with a signal peptide and a conserved domain of the TGF- β superfamily. Sequence alignment analysis reveals that the *gsdf* of *L. crocea* and *Dicentrarchus labrax* shared the highest homology. Phylogenetic analysis shows that the fish *Gsdf* proteins had a clade separated from the rest members of the TGF- β superfamily. The ORF of *amh* gene spanned a region of 1 563 bp and coded 520 amino acids that contained a signal peptide, an AMH-N domain and a TGF- β conserved domain. Phylogenetic analysis shows that *Amh* proteins of *L. crocea* and *D. labrax* had the nearest relationship. The qPCR analysis reveals that *gsdf* and *amh* genes were expressed mainly in gonad, and the expression levels in testis were significantly higher than that in ovary ($P < 0.05$). Before the gonad differentiation, *gsdf* and *amh* genes had already expressed, and the expression levels of two genes showed an increase-decrease trend in testis whereas the expression levels were very low in ovaries. Besides, compared with normal females, the expressions of two genes had more significant expression in gonad of pseudo-males (genetic females). It is indicated that *gsdf* and *amh* genes play a very important role in the process of *L. crocea* gonad differentiation.

Key words: *Larimichthys crocea*; gonadal soma derived factor (*gsdf*); anti-Müllerian hormone (*amh*); gene expression; gonad dif-

收稿日期: 2017-03-06; 修回日期: 2017-03-29

资助项目: 国家自然科学基金项目 (31602207); 厦门南方海洋研究中心重大项目 (14GZY70NF34)

作者简介: 林爱强 (1990-), 男, 硕士研究生, 从事鱼类遗传育种研究。E-mail: Aiqiang_L@163.com

通信作者: 王志勇 (1963-), 男, 教授, 从事水生生物遗传育种与生物技术研究。E-mail: zywang@jmu.edu.cn

ferentiation; real time fluorescence qPCR

动物界中普遍存在着性别二态性, 然而其性别决定机制却多种多样^[1], 有遗传性别决定, 环境性别决定, 更有两者共同作用的复杂机制。因此, 性别决定基因一直是生命科学研究的热点。自从发现人类和小鼠的性别决定基因 *SRY/Sry* 以来^[2-3], 已经在很多物种中发现不同的性别决定基因, 而且分析发现大多数的性别决定基因集中在转录因子部分, 如山羊 (*Capra hircus*) 雌性性别决定基因 *FOXL2*^[4], 鸡 (*Gallus gallus*) 和半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*) 的 *Dmrt1*^[5-6], 两栖类非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 的 *DM-W*^[7] 和青鳉 (*Oryzias latipes*) 的 *Dmy*^[8]。但是随着研究的深入, 发现很多非转录因子对于性别决定也起到非常重要的作用, 如吕宋青鳉 (*O. luzonensis*) 和裸盖鱼 (*Anoplopoma fimbria*) 的 *gsdf*^[9-10], 银汉鱼 (*Odontesthes hatcheri*) 的 *amhy*^[11] 以及红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*) 的 *amhr II*^[12] 等。转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 是一个拥有众多成员的超家族, 这一家族作用广泛, 除影响细胞的增殖、分化、凋亡, 对组织重塑和免疫功能有重要作用外, 同时还在胚胎发育、胞外基质形成、骨的形成和重建等方面也起着重要作用^[13]。在鱼类性别决定基因的研究中, 发现 TGF- β 信号通路成员在鱼类性别决定与分化中起重要作用。

Gsdf (gonadal soma derived factor) 和 *amh* (anti-Müllerian hormone) 都属于 TGF- β 超家族成员。*Gsdf* 基因最早在虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 中被发现, 在虹鳟性腺发育早期, *gsdf* 基因表达于原始生殖细胞 (primordial germ cell, PGC) 周围的体细胞中, 在性腺发育后期, 表达于精巢的支持细胞 (Sertoli cells) 以及卵巢的颗粒细胞 (granulosa cells) 中。同时, 在受精卵阶段敲降虹鳟 *gsdf* 基因的表达后, 虹鳟原始生殖细胞 PGC 的数目降低, 表明 *gsdf* 基因可能与原始生殖细胞和精原细胞的增殖有关^[14]。此后, 在多种硬骨鱼中成功克隆到 *gsdf* 基因, 如青鳉^[15]、银大麻哈鱼 (*Oncorhynchus kisutch*)^[16]、三斑海猪鱼 (*Halichoeres trimaculatus*)^[17]、斑马鱼 (*Danio rerio*)^[18]、尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)^[19] 等。特别是在罗非鱼的研究中, 通过靶向基因敲除技术敲除 *gsdf* 基因, 发现遗传雄性 (XY) 个体缺失 *gsdf* 基因导致其发生性逆转, 性腺发育为

卵巢, 而在遗传雌性 (XX) 个体过表达 *gsdf* 基因也能使性腺性逆转为精巢, 表明 *gsdf* 基因在罗非鱼性别决定中起重要作用。在这些研究中, *gsdf* 基因主要在性腺中表达, 因此被认为在鱼类性别决定、分化和生殖细胞的增殖过程中发挥重要的作用^[12,15-19]。抗缪勒氏管激素 AMH 属于 TGF- β 超家族的分泌型糖蛋白, 在哺乳动物中诱导雄性的缪勒氏管退化, 维持雄性特征。在雄性小鼠缺失 *Amh* 基因导致小鼠部分雌雄同体, 出现子宫和输卵管组织^[20]。研究表明, 在鱼类中并没有发现缪勒氏管, 但却存在 *amh* 或其同源基因。在银汉鱼中发现 *amh* 基因在 Y 染色体上有一个特异的复制 *amhy*, 且该基因在雄性特异表达, 时空表达发现 *amhy* 在银汉鱼受精后第 6 天的胚胎中开始表达于精巢的支持细胞中, 通过敲降 *amhy* 导致雌性特异基因的表达上调, 表明 *amhy* 是银汉鱼的性别决定基因^[11]。尽管已有研究表明 *gsdf* 和 *amh* 基因影响鱼类性别决定与分化过程, 但是在罗非鱼 (*Larimichthys crocea*) 中还未有 *gsdf* 和 *amh* 基因的研究报道。

大黄鱼属于鲈形目、石首鱼科、黄鱼属, 是中国重要经济海水鱼类, 人工育苗关键技术的突破, 使大黄鱼成为中国南方沿海网箱养殖面积最大、产量最高的海水鱼类^[21]。与大多海水鱼类相似, 大黄鱼生长存在雌雄差异, 雌性生长速度快于雄性且达到成熟时的个体通常也比雄性大, 使得雌鱼更具有市场价值, 有必要在大黄鱼养殖生产中开展全雌鱼培育和养殖。然而, 目前关于大黄鱼性别分化的调控网络以及有哪些基因参与到性别决定与分化都了解得很少, 大黄鱼的性别决定机制还不够清楚, 因此开展大黄鱼性别决定机制相关的研究, 探索大黄鱼单性育种技术, 对于大黄鱼养殖产业的发展具有重要意义和应用价值。该研究运用生物信息学的方法从转录组中注释到大黄鱼的 *gsdf* 及 *amh* 基因, 采用分子生物学方法克隆了大黄鱼 *gsdf* 和 *amh* 基因的 cDNA 序列, 同时使用实时荧光定量 PCR 研究这 2 个基因在大黄鱼不同组织、不同发育时期性腺的表达规律, 并分析它们在雌鱼诱导成伪雄性性腺组织中的表达变化, 以期为今后研究这 2 个基因和其他性别相关基因的调控关系及大黄鱼的性别决定与分化奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验样品 实验所用的人工养殖大黄鱼均采自福建省宁德市金陵水产科技有限公司。

1.1.2 实验试剂 DNA 提取试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒购自上海捷瑞生物工程有限公司; TransZol 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; GoScriptTM Reverse Transcription System (Promega) 购自上海泰京生物技术有限公司; *Taq* DNA 聚合酶、pMD19-T、SYBR[®] Premix Ex *Taq*TM II 试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa); 引物在华大基因合成。

1.2 实验方法

1.2.1 样品制备 研究所用大黄鱼样品分别为: 1) 孵化后第 6、第 13、第 20、第 27、第 34、第 41、第 49 和第 55 天分别采集鱼苗样品, 将整尾鱼完整浸入 RNA 保护液中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 1 d, 然后更换 RNA 保护液, -80°C 保存, 用于总 RNA 的提取; 2) 分别采集孵化后第 69、第 84、第 98、第 112 和第 123 天的大黄鱼样品, 用消毒的刀片去掉鱼的首尾, 剖开腹部去掉内脏后保存于 RNA 保护液中, 保存方法同上; 3) 取 8 月龄、12 月龄、16 月龄及 2 年龄的成熟大黄鱼性腺样品保存于 RNA 保护液中, 同时取对应每条鱼的鳍条用于基因组 DNA 提取。8 月龄前的样品每个时期至少取 20 尾, 8 月龄后的样品至少有 3 尾雌鱼和 3 尾雄鱼; 4) 分别取成熟的 3 尾雌鱼和 3 尾雄鱼的脑、眼、心脏、肝脏、脾脏、肾、头肾、肠、胃、肌肉和性腺共 11 个组织样品, 置于 RNA 保护液中, -80°C 保存; 5) 取 3 尾成熟的伪雄鱼性腺样品, 置于 RNA 保护液中, -80°C 冰箱保存, 取对应的胸鳍用于基因组 DNA 提取。所取鱼的鳍条组织置于 95% 的乙醇, -20°C 中保存, 用于提取 DNA 进行性别鉴定。

1.2.2 大黄鱼 DNA 的提取及遗传性别的鉴定

未成熟大黄鱼的性别难以根据其外部形态及性腺进行辨别。根据笔者实验室的研究发现, 大黄鱼基因组中存在雌雄差异的 DNA 片段(未发表), 根据该片段开发出的分子标记可以通过 PCR 扩增及琼脂糖电泳检测准确鉴定大黄鱼的遗传性别。该实验中, 首先使用 DNA 提取试剂盒分别提取不同发育时期的大黄鱼及成熟伪雄鱼鳍条的 DNA, 所提取的 DNA 用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测其质量并用

MULTISKAN GO 酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)测量 DNA 溶度, 并将 DNA 溶液稀释至 $30\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, -20°C 保存备用。然后根据笔者实验室开发的性别特异分子标记对大黄鱼进行遗传性别鉴定。PCR 扩增体系(共 $10\ \mu\text{L}$)为 ddH₂O $6.7\ \mu\text{L}$, $10\times$ PCR Buffer $1.0\ \mu\text{L}$, dNTP Mix ($2.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) $0.8\ \mu\text{L}$, 上、下游引物 ($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 序列见表 1)各 $0.2\ \mu\text{L}$, *Taq* DNA 聚合酶 ($5\ \text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) $0.1\ \mu\text{L}$, 模板 DNA $1.0\ \mu\text{L}$ 。PCR 反应程序为 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 30 s, 58°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min, 35 个循环; 最后 72°C 延伸 10 min, 于 4°C 保存。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测根据电泳条带的不同进行性别的判定。

1.2.3 大黄鱼 RNA 的提取和 cDNA 的合成 不同时期的大黄鱼经性别鉴定后, 根据 Trans Zol Up Plus RNA Kit 试剂盒操作说明分别提取不同发育时期大黄鱼的性腺总 RNA、雌雄大黄鱼成鱼各个组织中的总 RNA 及伪雄鱼性腺总 RNA, 并用 Dnase I 37°C 孵育 30 min 去除基因组 DNA。提取的 RNA 用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测其质量并用 MULTISKAN GO 酶标仪测量 RNA 浓度和质量。取提取的 RNA $2\ \mu\text{g}$, 根据 GoScriptTM Reverse Transcription System 试剂盒说明书合成 cDNA 的第一条链, cDNA 合成后用内参基因 β -actin 引物(序列见表 1)对 cDNA 进行检测。

1.2.4 大黄鱼 *gsdf* 和 *amh* 基因的克隆 利用笔者实验室已经测序的大黄鱼转录组数据, 经生物信息学分析得到大黄鱼 *gsdf* 和 *amh* 基因片段。根据参考序列, 分别在 *gsdf* 和 *amh* 开放阅读框(ORF)前后各设计 1 对引物 *gsdf*-O 和 *amh*-O(序列见表 1), 以大黄鱼精巢 cDNA 为模板, 进行 *gsdf* 和 *amh* 片段的 PCR 扩增。 $20\ \mu\text{L}$ PCR 反应体系包括 RNase Free dH₂O $13.4\ \mu\text{L}$ 、 $10\times$ Buffer $2\ \mu\text{L}$ 、dNTPs $1.6\ \mu\text{L}$ 、正反向引物 ($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)各 $0.4\ \mu\text{L}$ 、模板 cDNA $2\ \mu\text{L}$ 、*Taq* DNA 聚合酶 ($5\ \text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) $0.2\ \mu\text{L}$ 。PCR 反应条件为: 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 30 s, 60°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min, 35 个循环; 最后 72°C 延伸 10 min。扩增产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分离后用 DNA 凝胶回收试剂盒回收目的片段, 纯化后的产物与 pMD19-T 载体连接, 转化到感受态细胞 DH5 α , 经 LB 平板(含氨苄青霉素)培养后, 将筛选的阳性克隆送到华大基因有限公司进行测序。将测序的数据与参考序列进行比对

分析, 然后根据比对的序列设计荧光定量 PCR 引物 *gsdf*-Q、*amh*-Q (序列见表 1)。

1.2.5 序列比较分析 对所获得的 *gsdf* 和 *amh* 开放阅读框 cDNA 序列及其推导的氨基酸序列, 采用 Blast n/p 程序进行同源搜索。用 CLUSTAL W 程序对搜索得到的 *gsdf* 和 *amh* 核苷酸和氨基酸序列进行多序列比对。利用分析软件 MEGA 5.0 以 Neighbor-Joining 法构建系统树, Bootstrap 设置为 1 000。

1.2.6 实时荧光定量 PCR 采用 ABI7500 Real-time PCR 仪 (Applied Biosystems, 美国), 按照 SYBR Premix Ex Taq II 使用说明, 利用引物对 *gsdf*-Q 和 *amh*-Q (表 1) 进行实时定量 PCR 反应。以大黄鱼 β -actin 为内参, 应用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法确定各样品中 *gsdf* mRNA 和 *amh* mRNA 的相对含量。20 μ L 反应体系包括 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (2 \times) 10 μ L、ROX Reference Dye II 0.4 μ L、正反向引物 (10 μ mol \cdot L⁻¹) 各 0.4 μ L、模板 cDNA 50 ng, 其余体积用 RNase Free dH₂O 补齐。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 荧光采集 82 $^{\circ}$ C 10 s, 40 个循环; 熔解曲线反应条件为 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s。PCR 结束后确认扩增曲线及熔解曲线, 以确保其特异性。每个样品重复 3 次。

1.2.7 数据处理 实时荧光定量数据以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法处理, 相对表达量以平均值 \pm 标准误 ($\bar{X} \pm SE$) 表

示, 采用 SPSS 19.0 软件的 *t*-检验分析法比较不同组织中 *gsdf* 和 *amh* 基因表达量的差异, 显著性水平设为 0.05。

2 结果与分析

2.1 大黄鱼遗传性别的鉴定

利用笔者实验室开发的大黄鱼性别特异分子标记对大黄鱼进行遗传性别鉴定, 经琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物后, 根据电泳条带的情况便可判定待测个体的遗传性别 (图 1)。雄性个体有 2 个大小不同的片段, 而雌鱼仅有 1 个片段。据此, 判定了不同个体大黄鱼的遗传性别。此外, 经过人工诱导雌核发育的子代雌性个体, 用 17 α -甲基睾酮处理性逆转成伪雄鱼, 其性腺外形与大黄鱼雌鱼卵巢相似, 但是成熟的性腺里面生成精子, 通过此分子标记进一步确认其遗传性别是雌性。

2.2 大黄鱼 *gsdf* 和 *amh* 基因的克隆及序列分析

根据转录组拼接、注释得到的大黄鱼 *gsdf* 和 *amh* 基因的参考序列, 分别设计 1 对引物, 通过 PCR 对反转录产物进行扩增, 经胶回收、克隆、测序及比对分析分别得到了大黄鱼 *gsdf* 和 *amh* 基因开放阅读框的 cDNA 序列。大黄鱼 *gsdf* 基因 ORF 为 618 bp, 可编码 205 个氨基酸。推导的大黄鱼 *Gsdf* 氨基酸序列中含有信号肽和 TGF- β 结构域, 在 TGF- β 结构域内含有 9 个保守的半胱氨酸残基

表 1 相关引物及其碱基序列

Tab. 1 Primers and sequences used in the study

引物名 primer name	引物序列 (5' - 3') primer sequence	作用 function
mark-F	TGGCTCTGTGAGGCGTCT	性别鉴定
mark-R	ATACAATGATGACATCAATCCTGAT	
<i>gsdf</i> -O-F	ATGTCCTTTACGTTTCATTTGTCATG	开放阅读框扩增
<i>gsdf</i> -O-R	TTACTCTTCGCTGGGCTGCT	
<i>amh</i> -O-F	ATGTTGTCGGTGGATGTCTTCTG	
<i>amh</i> -O-R	TTAGCGGCATCCGCACTC	
<i>gsdf</i> -Q-F	CTGATGGTGGAAACAGTACGAGCC	荧光定量 PCR
<i>gsdf</i> -Q-R	AGAGTGCACACTGAACGACAGTC	
<i>amh</i> -Q-F	AGCCAACATCAACAACACTGCC	
<i>amh</i> -Q-R	TTCATCCAAGTCCACCACCT	
β -actin-F	TTATGAAGGCTATGCCCTGCC	β -actin 内参引物
β -actin-R	TGAAGGAGTAGCCACGCTCTGT	

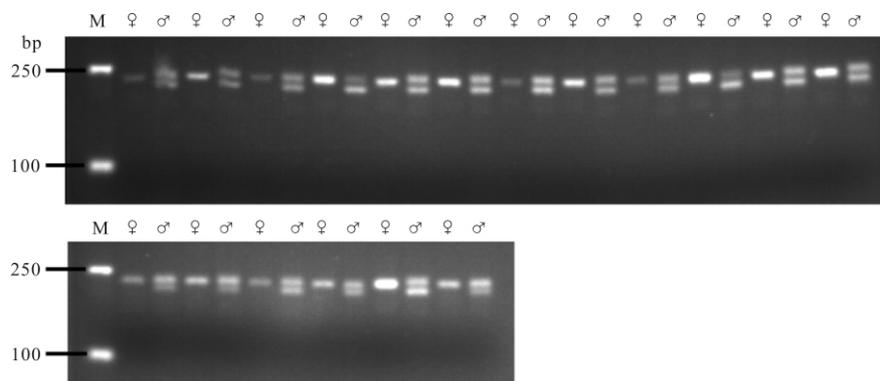


图1 大黄鱼遗传性别的鉴定

Fig. 1 Identification genetic sex of large yellow croaker

(图2)。使用 NCBI 的 Blastp 分析大黄鱼 *Gsdf* 氨基酸序列与其他物种的同源性(表2)。结果显示, 大黄鱼 *Gsdf* 氨基酸序列与舌齿鲈 (*Dicentrarchus labrax*) 同源性最高 (69%), 与青鲈同源性为 52%, 与斑马鱼的同源性仅有 33%。对鱼类 *Gsdf* 氨基酸序列与 TGF- β 超家族内的其他成员使用 MEGA 5.0 构建系统发育树。结果显示, 鱼类 *Gsdf* 单独聚为一枝, 与超家族内的其他成员分开, 大黄鱼与赤点石斑鱼 (*Epinephelus akaara*)、裸盖鱼的亲缘关系较近, 先聚为一枝, 然后再与其他鱼类聚在一起(图3)。大黄鱼 *amh* 基因 ORF 为 1563 bp, 可编码 520 个氨基酸。推导的大黄鱼 *Amh* 氨基酸序列中含有信号肽, 并包含 1 个 AMH-N 区域和 TGF- β 结构域, 在 AMH-N 区域内含有 3 个保守的半胱氨酸残基, 在 TGF- β 结构域内含有 7 个保守的半胱氨酸残基(图4)。使用 NCBI 的 Blastp 分析大黄鱼 *Amh* 氨基酸序列与其他物种的同源性(表3), 结果显示, 大黄鱼 *Amh* 氨基酸序列与舌齿鲈相似性最高 (76%), 与青鲈相似性为 53%, 与斑马鱼相似性最低 (42%)。使用 MEGA 5.0 对大黄鱼 *Amh* 氨基酸序列与其他脊椎动物的 *Amh* 构建系统发育树, 结果显示大黄鱼 *Amh* 紧密的和其他鱼类 *Amh* 聚为一枝, 且与鲈形目的亲缘关系最近(图5)。

2.3 大黄鱼 *gsdf* 和 *amh* 基因在不同组织、不同发育时期及伪雄鱼性腺的表达分析

通过实时荧光定量 PCR 对雌性和雄性大黄鱼脑、眼、心脏、肝脏、脾脏、肾、头肾、肠、胃、肌肉和性腺共 11 个组织进行表达分析, 结果显示在这些组织中 *gsdf* 和 *amh* 基因的表达量存在很大

表2 大黄鱼 *Gsdf* 氨基酸序列的同源性分析Tab. 2 Homology of *L. crocea* *Gsdf* amino acid sequence with other species

物种 species	基因 gene	相似性/% similarity
舌齿鲈 <i>Dicentrarchus labrax</i>	<i>gsdf1</i>	69
赤点石斑鱼 <i>Epinephelus akaara</i>	<i>gsdf</i>	67
舌齿鲈 <i>Dicentrarchus labrax</i>	<i>gsdf2</i>	66
黄鲈 <i>Monopterus albus</i>	<i>gsdf</i>	63
裸盖鱼 <i>Anoplopoma fimbria</i>	<i>gsdf</i>	62
黄鳍棘鲷 <i>Acanthopagrus latus</i>	<i>gsdf</i>	61
斑马宫丽鱼 <i>Maylandia zebra</i>	<i>gsdf</i>	60
尼罗罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	<i>gsdf</i>	60
莫桑比克罗非鱼 <i>Oreochromis mossambicus</i>	<i>gsdf</i>	59
大菱鲆 <i>Scophthalmus maximus</i>	<i>gsdf</i>	59
三斑海猪鱼 <i>Halichoeres trimaculatus</i>	<i>gsdf</i>	58
红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i>	<i>gsdf</i>	53
青鲈 <i>Oryzias latipes</i>	<i>gsdf</i>	52
虹鲷 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>gsdf</i>	43
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	<i>gsdf</i>	33

差异。*Gsdf* 基因特异表达于大黄鱼性腺中, 而且在精巢中高表达, 约是卵巢中的 6 倍, 在其他组织未检测到有表达; *amh* 基因同样在精巢中高表达, 约是卵巢中的 8 倍, 而在其他组织表达量很低(图6-a 和 6-b)。对大黄鱼 *gsdf* 和 *amh* 基因在性腺不同发育时期的表达分析表明, 在雄鱼精巢中 *gsdf* 和 *amh* 基因都在孵化后第 41 天 (41 dph) 检测到微量表达, 而在孵化后 55 dph 表达都明显上调, 在孵化后 123 dph 达到最高峰, 此后表达量下降。与

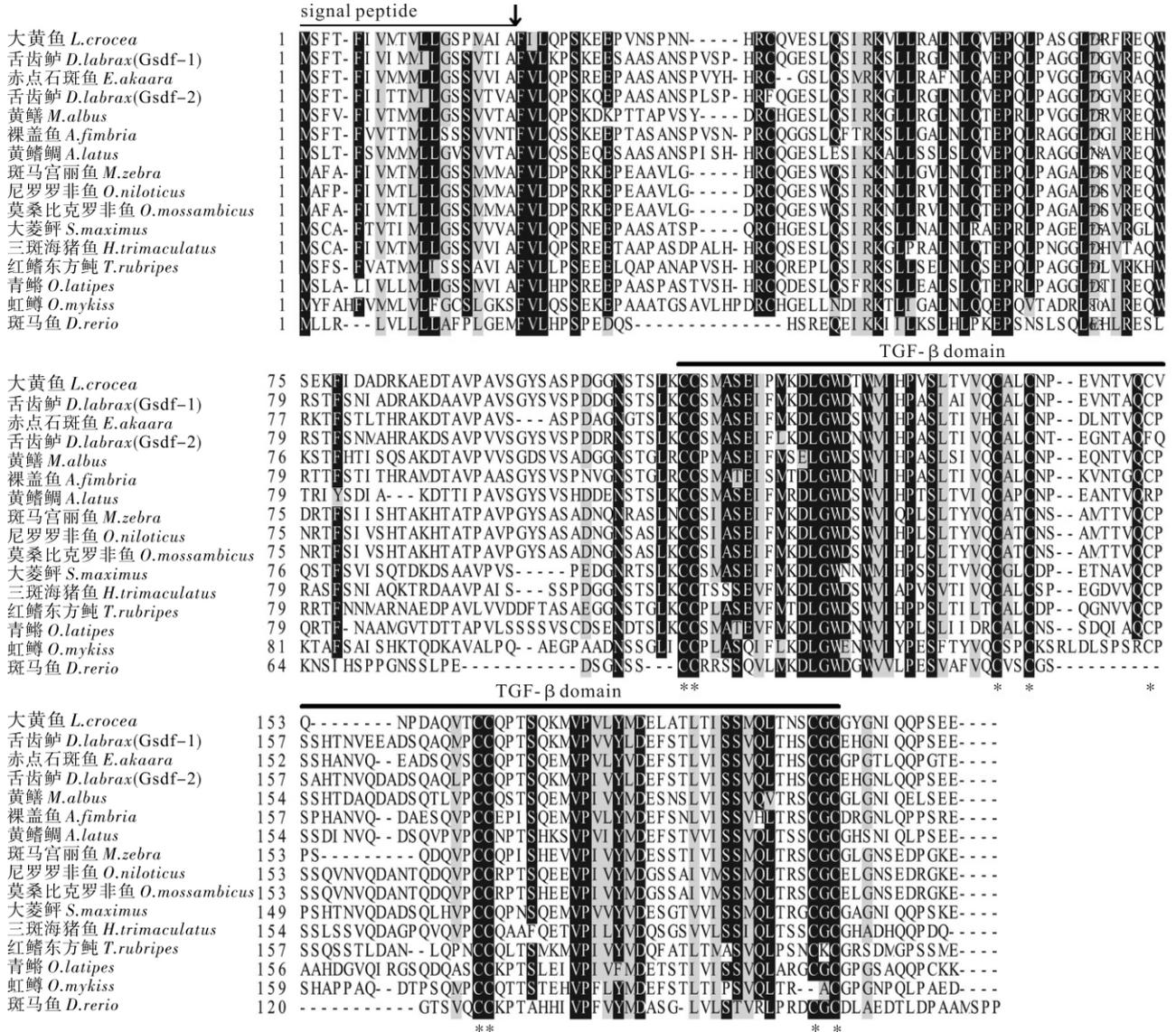


图 2 大黄鱼 Gsdf 氨基酸序列和其他鱼类 Gsdf 氨基酸序列的比较

箭头代表信号肽切割位点，黑色上画线为 TGF-β 结构域，9 个保守的半胱氨酸残基用星号表示

Fig. 2 Alignment of amino acid of *L. crocea* *gsdf* with other vertebrate fishes

The arrow indicates the putative cleavage sites of the signal peptide. The TGF-β domain is labeled with black overline.

The nine positions with conserved cysteines are marked by asterisks.

此相比，在卵巢中 *gsdf* 和 *amh* 基因表达量都很低，*gsdf* 基因在卵巢中的表达量也呈现先升高后下降的趋势，且在孵化后 123 dph 达到最高；而 *amh* 基因在卵巢中的表达量一直处于很低的水平 (图 7-a 和 7-b)。此外，对大黄鱼 *gsdf* 和 *amh* 基因在成熟的正常雌雄鱼和伪雄鱼性腺的表达量分析显示，相对于正常雌鱼，*gsdf* 和 *amh* 基因在伪雄鱼性腺的表达量显著上升 (图 8-a 和 8-b)。

3 讨论

从发现虹鳟 *gsdf* 基因以来，不断地在斑马鱼、

红鳍东方鲀、三刺鱼 (*Gasterosteus aculeatus*) 和青鳉等鱼类中发现该基因。然而，此前的研究发现 *gsdf* 基因仅限于硬骨鱼类，后来在肉鳍鱼类矛尾鱼 (*Latimeria menadoensis*)^[22] 和软骨鱼类象鲨 (*Callorhynchus milii*)^[19] 中也发现了 *gsdf* 基因，表明 *gsdf* 基因不只是存在于硬骨鱼类。目前，在比鱼类更原始的物种中，以及鱼类之后的四足类中都未能发现 *gsdf* 的同源基因^[23]，推测 *gsdf* 基因可能只特定存在于鱼类，并且该基因的出现有可能是基因组复制的产物。结合主流的基因组复制学说，第一次基因组复制发生在脊椎动物有颌类和无颌类分离前，而

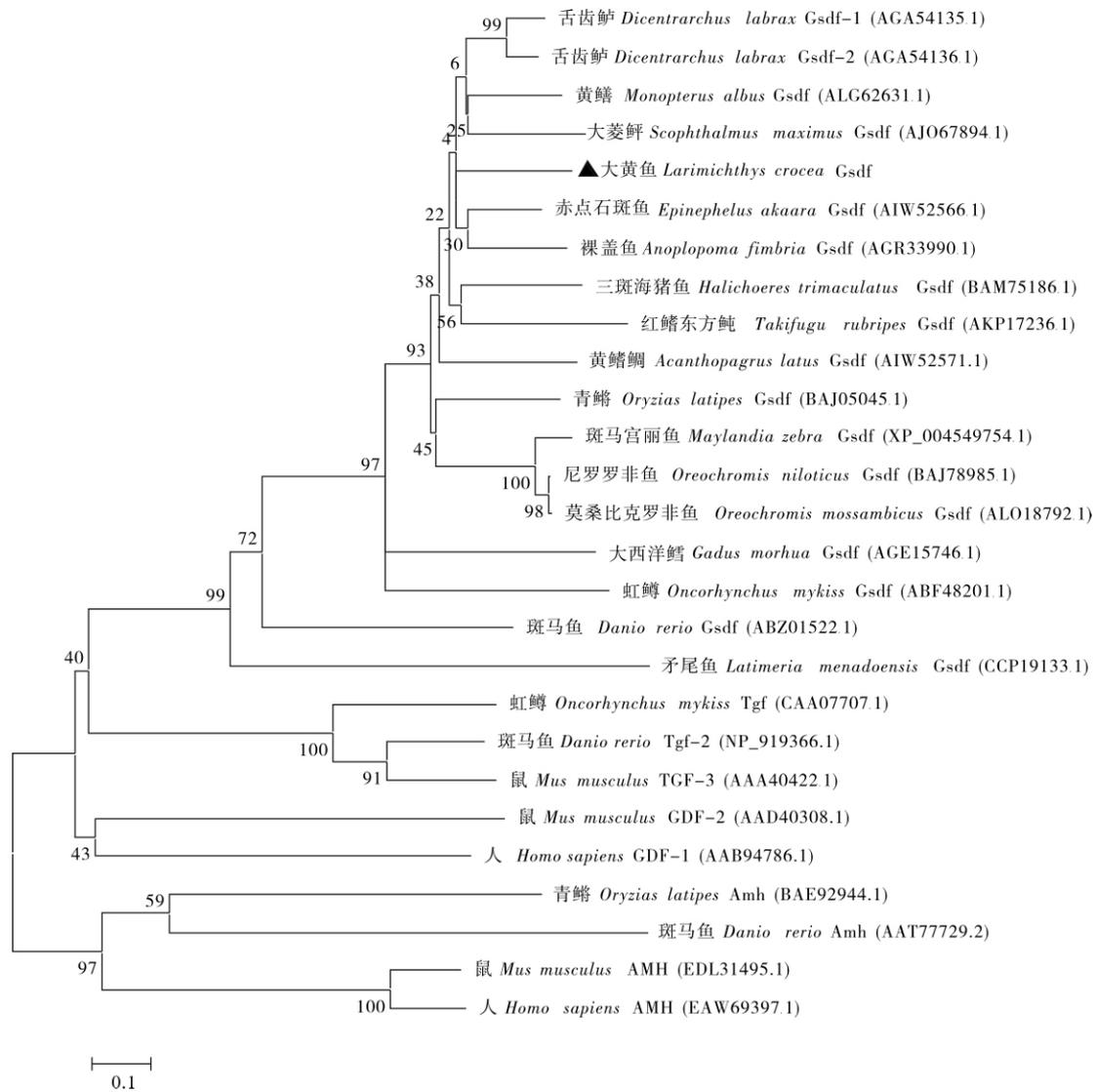


图 3 大黄鱼 *Gsdf* 与其他物种 TGF-β 超家族成员系统进化分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of *L. crocea* *Gsdf* and other species TGF-β superfamily members

表 3 大黄鱼 *Amh* 氨基酸序列的同源性分析

Tab. 3 Comparative identity of *L. crocea* *Amh* amino acid sequence with other species

物种 species	相似性/% similarity
舌齿鲈 <i>Dicentrarchus labrax</i>	76
裸盖鱼 <i>Anoplopoma fimbria</i>	71
金钱鱼 <i>Scatophagus argus</i>	70
奥利亚罗非鱼 <i>Oreochromis aureus</i>	67
银汉鱼 <i>Odontesthes bonariensis</i>	61
三斑海猪鱼 <i>Halichoeres trimaculatus</i>	60
青鳉 <i>Oryzias latipes</i>	53
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	49
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	42

第二次基因组复制只发生在有颌类，第三次基因组复制是辐鳍鱼类特有的基因组复制^[24]，推测 *gsdf* 基因可能是在第二次基因组复制而产生的新基因，且该基因对于鱼类有特殊的功能。该研究中氨基酸序列分析显示，大黄鱼 *Gsdf* 存在 TGF-β 功能结构域，且在该保守域内有 9 个半胱氨酸残基。在鱼类中，TGF-β 这些半胱氨酸残基相对保守，即其保守半胱氨酸的数量稍有不同。与大黄鱼相比，在三刺鱼 *Gsdf* 蛋白的 TGF-β 保守域内，缺少第 6 位的半胱氨酸残基；而在虹鳟的 *Gsdf* 则缺少第 9 位的半胱氨酸残基^[17]。TGF-β 超家族成员总体上有 6 个保守半胱氨酸^[14]，这种结构上的保守也可能说明了其在功能上的保守。系统进化分析显示，大黄鱼

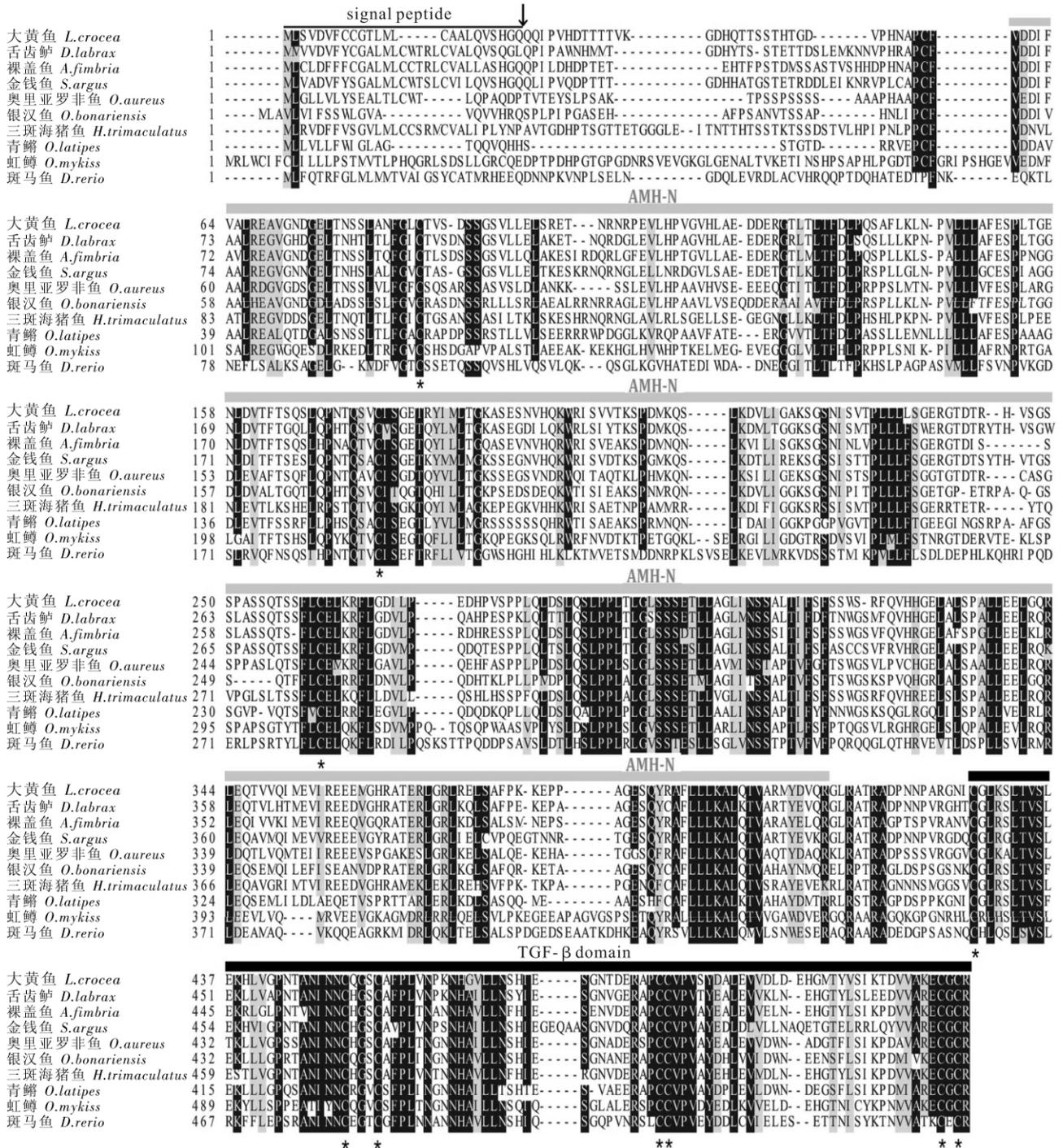


图 4 大黄鱼 Amh 氨基酸序列和其他鱼类 Amh 氨基酸序列的比较

箭头代表信号肽切割位点，灰色上画线为 AMH-N 区域，黑色上画线为 TGF-β 结构域，10 个保守的半胱氨酸残基用星号表示

Fig. 4 Alignment of amino acid of *L. crocea* Amh with other vertebrate fishes

The arrow indicates the putative cleavage sites of the signal peptide. The AMH-N domain and the TGF-β domain that characterized this family are labelled with gray and black overline, respectively. The ten positions with conserved cysteines are marked by asterisks.

的 Gsdf 与其他鱼类的 Gsdf 聚为一枝，而与 TGF-β 超家族的其他成员相分离，表明 Gsdf 是 TGF-β 超家族一个独特的成员，也可能预示着 Gsdf 具有系谱特异的功能。

在该研究中，采用实时荧光定量 PCR 比较了 *gsdf* 基因在大黄鱼不同组织的表达量，结果发现，*gsdf* 基因在大黄鱼的性腺特异表达且在精巢高表达，在精巢的表达量约为卵巢的 6 倍以上，而在大

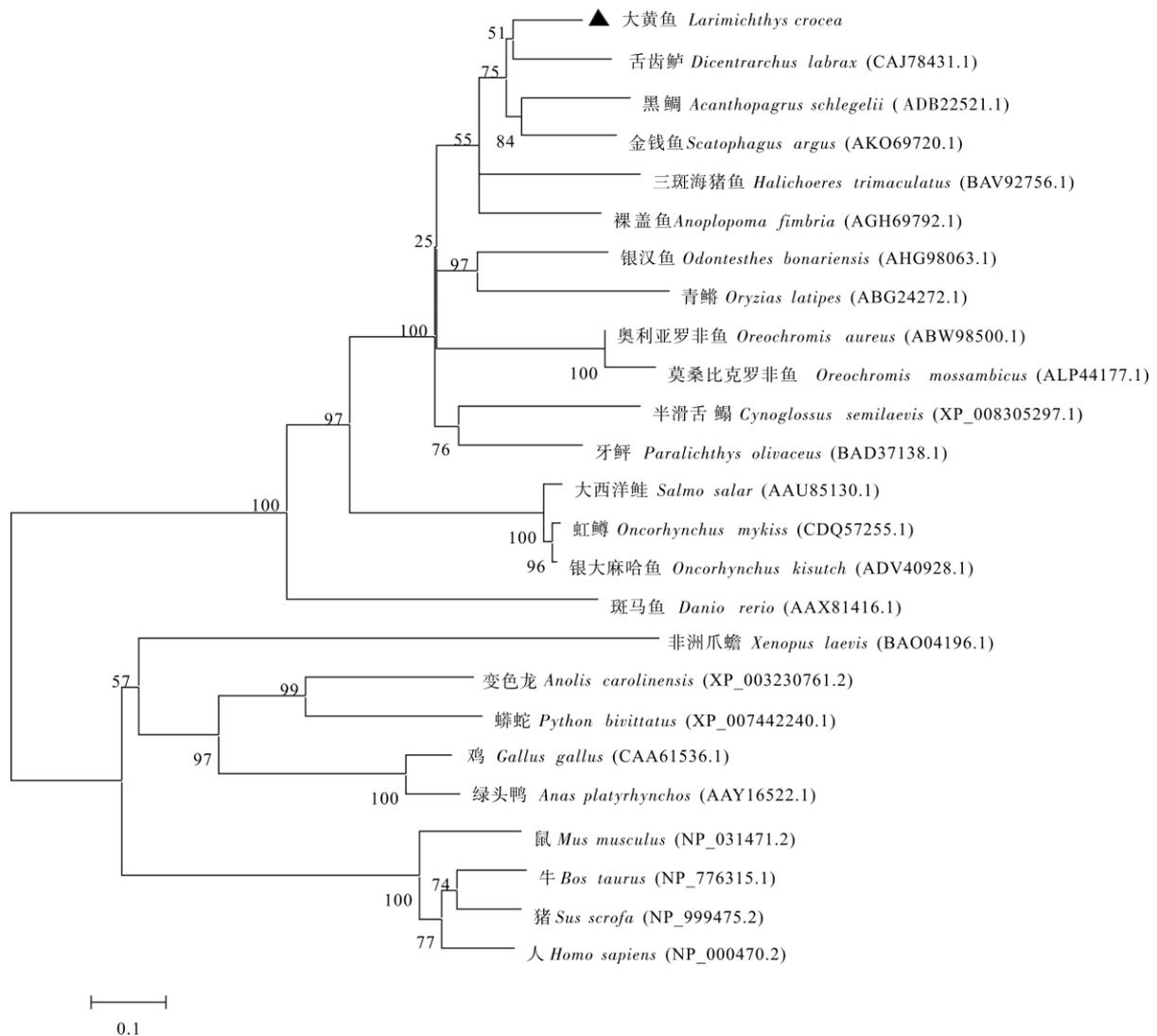


图5 基于 Amh 氨基酸序列的大黄鱼与其他物种系统发育分析

Fig. 5 Phylogenetic analysis based on Amh amino acid sequences in *L. crocea* and other species

黄鱼的其他组织中不表达, 表明 *gsdf* 基因主要在大黄鱼的性腺中发挥功能。此结果与其他鱼类的研究结果相似, 在尼罗罗非鱼和青鳉中^[15,25], *gsdf* 基因只特异在性腺中表达, 其他组织不表达, 而且在精巢中的表达量显著高于卵巢, 预示 *gsdf* 基因只在性腺中发挥作用, 特别是在精巢中发挥重要的功能。此外, 通过原位杂交 (ISH) 发现, 在三斑海猪鱼和青鳉精巢的支持细胞中有很强的 *gsdf* 基因表达信号, 而只在卵巢的颗粒细胞发现微弱的表达信号^[15,17]。在这些鱼中, *gsdf* 表现出明显的性别表达差异模式, 表明 *gsdf* 基因在鱼类性腺发育过程中发挥独特的作用。

通过荧光定量 PCR, 最先在孵化后第 41 天的大黄鱼雄鱼性腺中检测到 *gsdf* 基因的表达, 而雌

鱼性腺中未发现表达, 表现出性别差异。根据游秀容等^[26]对大黄鱼性腺分化的研究, 大黄鱼卵巢的分化早于精巢, 约在孵化后第 55 天, 半数幼鱼性腺中形成成簇发育的卵原细胞群, 减数分裂和卵巢腔的形成约在孵化后第 60 天。因此, 该研究中 *gsdf* 基因的表达要明显早于大黄鱼性腺的分化。相似的发现在罗非鱼^[25]中报道过, 罗非鱼性腺分化在孵化后第 25 天左右, 然而, 通过 ISH 研究发现罗非鱼 *gsdf* 基因的表达开始于孵化后第 4 天未分化的 XY 鱼苗的性腺, 且此时在 XX 鱼苗性腺中未检测到 *gsdf* 信号, 表明 *gsdf* 基因在未分化的性腺中已经行使其功能。在虹鳟孵化前, 即性腺还未分化, 通过抑制 *gsdf* 基因的翻译, 发现原始生殖细胞的增殖受到抑制, 推断在性腺分化前 *gsdf* 基因

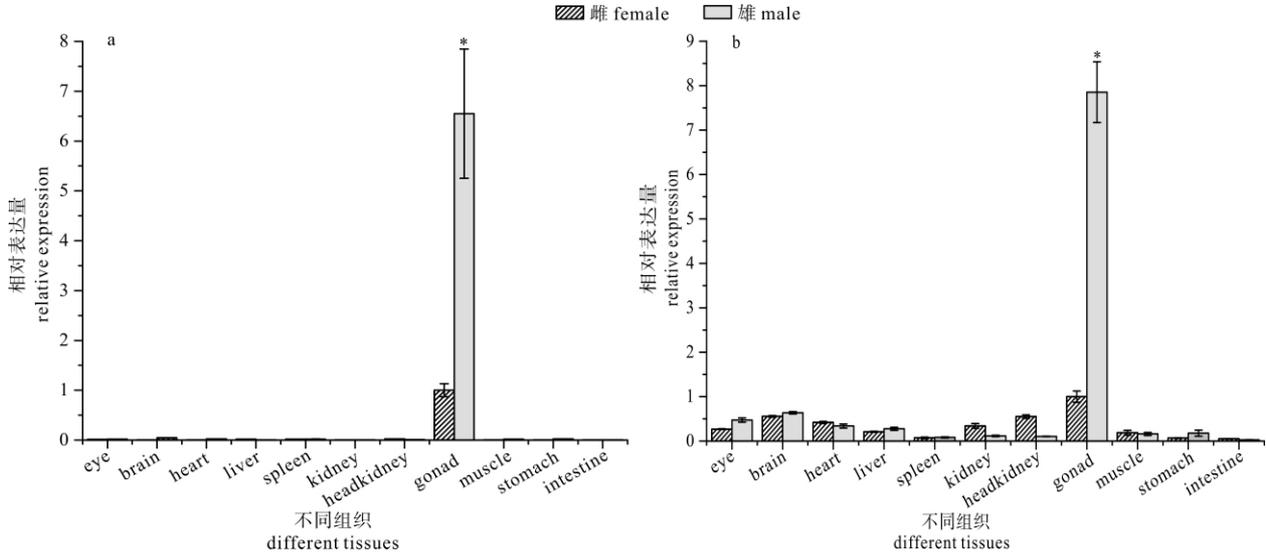


图6 *gsdF* (a)和*amh* (b)基因在大黄鱼不同组织中的表达

eye. 眼; brain. 脑; heart. 心脏; liver. 肝; spleen. 脾; kidney. 肾; headkidney. 头肾; gonad. 性腺; muscle. 肌肉; stomach. 胃; intestine. 肠; *表示性腺表达量差异显著 ($P < 0.05$), 且标在表达量较高的一侧

Fig. 6 Expressions of *gsdF* (a) and *amh* (b) genes in different *L. crocea* tissues

“*” indicates significant difference between gonads and appears above the higher expression ($P < 0.05$) and was marked on the higher expression value.

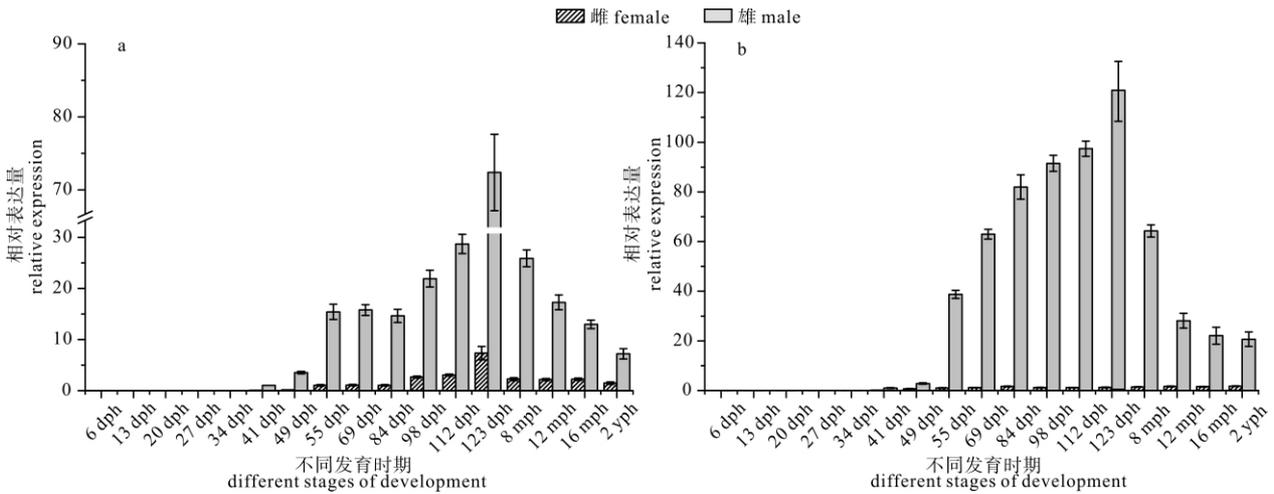


图7 *gsdF* (a)和*amh* (b)基因在大黄鱼不同发育时期性腺中的相对表达

Fig. 7 Expressions of *gsdF* (a) and *amh* (b) genes in *L. crocea* gonads during different post-embryonic stages

对原始生殖细胞的增殖可能起到重要的作用^[14]。第41天后大黄鱼 *gsdF* 基因在雄鱼性腺中的表达量逐渐上升, 并且在123日龄左右达到最高峰。大黄鱼精巢分化约在95日龄左右, 在这段时间 *gsdF* 基因的表达升高, 结合其他鱼类 *gsdF* 基因特异表达于原始生殖细胞周围的体细胞中而且在精原细胞周围体细胞高表达, 推测在这一发育阶段 *gsdF* 基因的表达水平升高促进体细胞的扩散或者精原干细胞的增殖。*GsdF* 基因在大黄鱼雌鱼性腺中也有少量表

达, 推测其对于卵巢的发育有一定的调控作用, 但是具体作用还要进一步研究。

Amh 是一种分泌性糖蛋白, 普遍存在于脊椎动物中, 由一个长的 N 末端和短的 C 末端组成^[27]。该研究中, 通过对大黄鱼 *Amh* 氨基酸序列和其他鱼类 *Amh* 的同源性比对发现, 大黄鱼 *Amh* 与舌齿鲈、裸盖鱼和金钱鱼的同源性比较高, 超过70%。同时, 可以发现 *Amh* 在 C 端保守性较高, 含有7个保守的半胱氨酸残基, 由于 *Amh* 有活性

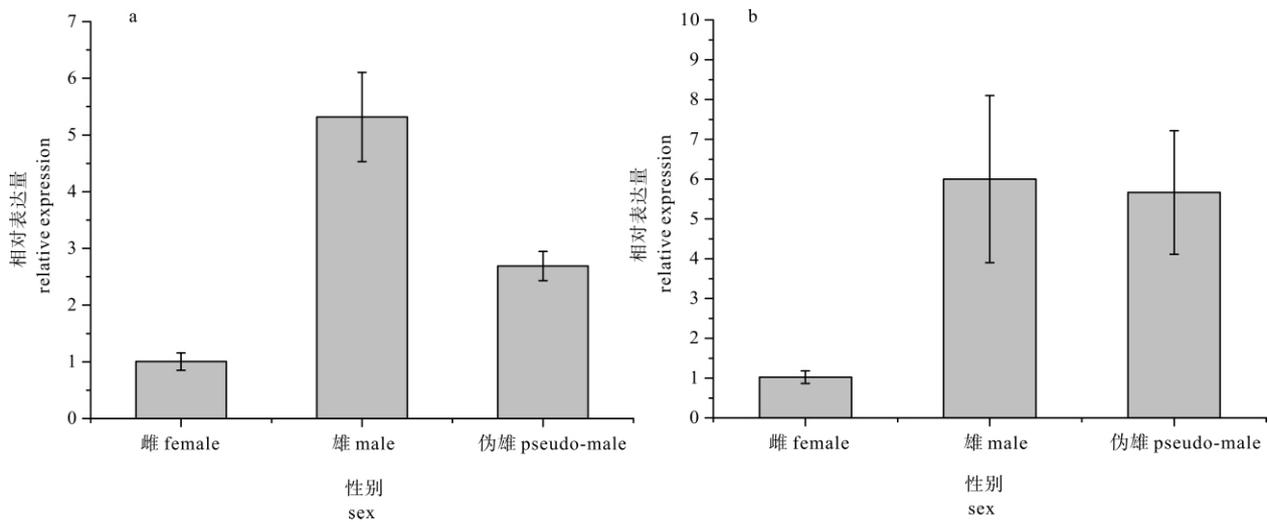


图8 *gsdf* (a)和 *amh* (b)基因在大黄鱼正常雌雄鱼和伪雄鱼性腺中的相对表达

Fig. 8 Expressions of *gsdf* (a) and *amh* (b) genes in different *L. crocea* gonads from females, males and pseudo-males

的区域是C末端,而N末端无生物活性,起到辅助C末端穿过细胞膜并分泌的作用,因此其结构上的保守是必要的。在构建的进化树中,大黄鱼Amh与其他鱼类Amh紧密聚为一枝,且与舌齿鲈的亲缘关系最相近,这与氨基酸序列比对的结果一致,说明在进化过程中该基因具有一定的保守性。

该研究中,采用实时荧光定量PCR方法对大黄鱼*amh*基因在不同组织的表达量进行分析。结果显示,大黄鱼*amh*基因主要在大黄鱼的性腺表达且在精巢高表达,其他组织表达很低或者不表达。在很多鱼类的研究中发现*amh*基因并非性腺特异基因,在舌齿鲈的脑、性腺、垂体和心脏等组织中都有发现*amh*基因的表达^[28];半滑舌鳎*amh*基因除在性腺显著表达,在血液、皮肤和脑中也有表达^[29]。特别的是,大黄鱼脑中*amh*基因也有一定的表达。在脊椎动物体中,下丘脑-垂体-性腺轴是重要的内分泌调节系统,脑及其分泌的激素在脊椎动物性别分化与性腺发育过程中起着重要的作用,结合其他鱼类在垂体检测到*amh*基因的表达,推测*amh*基因可能在下丘脑-垂体-性腺轴中发挥一定作用。

与*gsdf*基因相似,在对不同发育时期大黄鱼性腺中*amh*基因的表达量进行分析发现,同样在孵化后第41天的雄鱼性腺中检测到*amh*基因的表达,在雌鱼的性腺中不表达,此时大黄鱼性腺还未分化。此后*amh*基因在雄鱼性腺的表达量上升,特别是在55日龄显著上升,可能预示着*amh*基因

在这个时间段的大黄鱼雄鱼性腺中有着重要的作用。这与对斑马鱼和半滑舌鳎的研究相似,斑马鱼中性腺显著分化是在受精后第31天,而在受精后第17天未分化的性腺就发现了*amh*基因的表达,此后表达逐渐上升,并在第33天的精巢中高表达^[30];半滑舌鳎中发现*amh*基因在孵化后第70天之前未分化的雄鱼性腺中有较低的表达,在第70天即性腺分化前后表达水平显著升高且达到最高峰^[29]。许多研究发现,*amh*基因表达于未成熟精巢的支持细胞中,并且直到性腺成熟,此外,*amh*基因高表达会抑制雄性精子的形成^[31-32]。该研究中,*amh*基因在第112天的雄鱼性腺中的表达量达到最高峰后出现下降,并在此后维持较低水平到性腺成熟。在大西洋鲑(*Salmo salar*)未成熟的精巢中*amh*基因持续高表达,而在精子快速增殖时开始下降,在精子生成最多时*amh*基因的表达量最低^[33]。推测在大黄鱼中*amh*基因的表达量在成鱼期间维持较低的水平,可能是精子的形成抑制了*amh*基因的表达。通过这些研究表明,*amh*基因对鱼类性腺的分化和发育,特别是雄鱼精巢的分化和发育有很大的作用。此外,*amh*基因在大黄鱼卵巢中也有少量表达,相似的结果曾在金钱鱼(*Scatophagus argus*)^[34]的研究中报道过。Amh基因在金钱鱼Ⅲ、Ⅳ期的卵巢中表达量升高,这2个时期为卵母细胞大生长期和卵黄充满期,表现为滤泡膜细胞分裂增殖,逐渐积累卵黄,因此认为*amh*基因可能在金钱鱼卵泡发育过程中发挥作用,但其在鱼类

卵巢中的作用还需深入的研究。

鱼类性别分化容易受到外界环境的影响,外源性激素对于鱼类的性别分化具有重要的作用,已经有多种鱼类成功用外源激素诱导使其发生性别逆转。为了研究 *gsdf* 和 *amh* 基因在性别逆转大黄鱼性腺中的表达变化,该研究利用 17 α -甲基睾酮投喂雌核发育后代的大黄鱼雌鱼幼苗,使得大黄鱼的生理性别出现逆转,变成伪雄鱼。通过荧光定量 PCR 发现, *gsdf* 基因在伪雄鱼性腺中的表达量显著高于其在雌鱼性腺中的表达量,预示 *gsdf* 基因在性别逆转中受到调控,因此表达量发生变化。黄鳢 (*Monopterus albus*)^[55] 中 *gsdf* 基因在卵巢低表达,在由雌性向雄性逆转的精巢中表达量上升,在卵精巢的后期表达量达到最高峰;相似的结果在三斑海猪鱼^[17]中也有报道,这些结果表明 *gsdf* 基因可能在性别逆转中发挥潜在的作用。相比于正常雌鱼, *amh* 基因在大黄鱼伪雄鱼性腺的表达量也显著上升,接近于在雄鱼精巢中的表达量,这与半滑舌蛄^[29]相似。半滑舌蛄中 *amh* 基因在伪雄鱼性腺的表达量显著高于正常雌鱼性腺的表达量。由此说明, *amh* 基因可能参与了这些鱼类的性逆转过程,在精巢发育中起到了一定的作用。

Gsdf 和 *amh* 基因同是 TGF- β 超家族成员,而 TGF- β 不仅能影响细胞的增殖、分化,还在胚胎发育等方面起着重要作用。该研究中观察到, *gsdf* 和 *amh* 基因都在大黄鱼性腺中显著表达,且在精巢高表达,在性逆转的性腺中表达量发生显著变化,说明 *gsdf* 和 *amh* 基因在大黄鱼性别分化和性腺发育中起到了重要作用。因此,该研究对大黄鱼 *gsdf* 和 *amh* 基因的克隆和表达进行分析,为探讨大黄鱼性别决定及分化的机制奠定了基础。但是,更多关于大黄鱼 *gsdf* 和 *amh* 基因的功能,可通过基因敲除或敲降和过表达,或借助 CRISPR/Cas9 介导的基因组定点编辑技术进行定向诱变,再配合细胞学方面的研究,来分析它们潜在的功能,从而进一步了解它们在大黄鱼性别调控中的作用,为大黄鱼性别控制及单性育种奠定基础。

参考文献:

- [1] OSPINA-ÁLVAREZ N, PIFERRER F. Temperature-dependent sex determination in fish revisited: prevalence, a single sex ratio response pattern, and possible effects of climate change [J]. *PLoS One*, 2008, 3 (7): e2837.
- [2] 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.
- [3] KOOPMAN P, GUBBAY J, VIVIAN N, et al. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry [J]. *Nature*, 1991, 351 (6322): 117-121.
- [4] BOULANGER L, PANNETIER M, GALL L, et al. *FOXL2* is a female sex-determining gene in the goat [J]. *Curr Biol*, 2014, 24 (4): 404-408.
- [5] SMITH C A, ROESZLER K N, OHNESORG T, et al. The avian Z-linked gene *DMRT1* is required for male sex determination in the chicken [J]. *Nature*, 2009, 461 (7261): 267-271.
- [6] CHEN S L, ZHANG G J, SHAO C W, et al. Whole-genome sequence of a flatfish provides insights into ZW sex chromosome evolution and adaptation to a benthic lifestyle [J]. *Nat Genet*, 2014, 46 (3): 253-260.
- [7] YOSHIMOTO S, OKADA E, UMEMOTO H, et al. A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis* [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2008, 105 (7): 2469-2474.
- [8] 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.
- [9] RONDEAU E B, MESSMER A M, SANDERSON D 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.
- [10] 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.
- [11] HATTORI R S, MURAI Y, OURA M, et al. A Y-linked anti-Müllerian hormone duplication takes over a critical role in sex determination [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2012, 109 (8): 2955-2959.
- [12] 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 Genet*, 2012, 8 (7): e1002798.
- [13] WHITMAN M. Smads and early developmental signaling by the TGF β superfamily [J]. *Genes Dev*, 1998, 12 (16): 2445-2462.
- [14] 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]. *Dev Biol*, 2007, 301 (1): 266-275.
- [15] 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 Expr Patterns*, 2010, 10 (6): 283-289.
- [16] CRESPO B, CÓMEZ A, MAZÓN M J, et al. Isolation and

- characterization of Ff1 and Gsdf family genes in European sea bass and identification of early gonadal markers of precocious puberty in males [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2013, 191 (9): 155-167.
- [17] HORIGUCHI R, NOZU R, HIRAI T, et al. Characterization of gonadal soma-derived factor expression during sex change in the protogynous wrasse, *Halichoeres trimaculatus* [J]. *Dev Dyn*, 2013, 242 (4): 388-399.
- [18] GAUTIER A, SOHM F, JOLY J S, et al. The proximal promoter region of the zebrafish *gsdf* gene is sufficient to mimic the spatio-temporal expression pattern of the endogenous gene in Sertoli and granulosa cells [J]. *Biol Reprod*, 2011, 85 (6): 1240-1251.
- [19] 杨惠惠. 罗非鱼 *gsdf* 在性腺的表达及其在性别决定中的功能 [D]. 重庆: 西南大学, 2014: 13-55.
- [20] JAMIN S P, ARANGO N A, MISHINA Y, et al. Genetic studies of the AMH/MIS signaling pathway for Müllerian duct regression [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2003, 211 (1/2): 15-19.
- [21] HONG W S, ZHANG Q Y. Review of captive bred species and fry production of marine fish in China [J]. *Aquaculture*, 2003, 227 (1/2/3/4): 305-318.
- [22] FORCONI M, CANAPA A, BARUCCA M, et al. Characterization of sex determination and sex differentiation genes in *Latimeria* [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (4): e56006.
- [23] 闫红伟, 田雨顺, 姜丽楠, 等. 红鳍东方鲀 *gsdf* 基因的克隆及表达模式分析 [J]. *大连海洋大学学报*, 2016, 31 (2): 140-146.
- [24] ESCRIVA H, MANZON L, YOUSON J, et al. Analysis of lamprey and hagfish genes reveals a complex history of gene duplications during early vertebrate evolution [J]. *Mol Biol Evol*, 2002, 19 (9): 1440-1450.
- [25] KANEKO H, IJIRI S, KOBAYASHI T, et al. Gonadal soma-derived factor (*gsdf*), a TGF-beta superfamily gene, induces testis differentiation in the teleost fish *Oreochromis niloticus* [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2015, 415 (1): 87-99.
- [26] 游秀容, 蔡明夷, 姜永华, 等. 大黄鱼性腺性别分化的组织学观察 [J]. *水产学报*, 2012, 36 (7): 1057-1064.
- [27] JOSSO N, BELVILLE C, DI CLEMENTE N, et al. AMH and AMH receptor defects in persistent Müllerian duct syndrome [J]. *Hum Reprod Update*, 2005, 11 (4): 351-356.
- [28] HALM S, ROCHA A, MIURA T, et al. Anti-Müllerian hormone (AMH/AMH) in the European sea bass: its gene structure, regulatory elements, and the expression of alternatively-spliced isoforms [J]. *Gene*, 2007, 388 (1/2): 148-158.
- [29] 刘姗姗, 孙冰, 梁卓, 等. 半滑舌鳎抗缪勒氏管激素 (AMH) 基因的克隆及组织表达分析 [J]. *中国水产科学*, 2013, 20 (1): 35-43.
- [30] RODRÍGUEZ-MARÍ A, YAN Y L, BREMILLER R A, et al. Characterization and expression pattern of zebrafish anti-Müllerian hormone *amh* relative to *sox9a*, *sox9b*, and *cyp19a1a*, during gonad development [J]. *Gene Expr Patterns*, 2005, 5 (5): 655-667.
- [31] AL-ATTAR L, NOËL K, DUTERTRE M, et al. Hormonal and cellular regulation of Sertoli cell anti-Müllerian hormone production in the postnatal mouse [J]. *J Clin Invest*, 1997, 100 (6): 1335-1343.
- [32] CHEN Y P, WU W H, WU H M, et al. Effects of anti-Müllerian hormone and follicle stimulating hormone levels on *in vitro* fertilization pregnancy rate [J]. *Taiwan J Obstet Gynecol*, 2014, 53 (3): 313-316.
- [33] MAUGARS G, SCHMITZ M. Changes in expression profiles of genes related to sexual maturation during spermatogenesis in testes of early-maturing male Atlantic salmon parr, *Salmo salar* [J]. *Cy-bium*, 2008, 32 (2): 167-168.
- [34] 曾文刚, 刘振浩, 李红, 等. 金钱鱼抗缪勒氏管激素基因克隆及其在性腺发育不同时期 mRNA 表达水平的分析 [J]. *水产学报*, 2015, 39 (11): 1604-1612.
- [35] ZHU Y, WANG C, CHEN X, et al. Identification of gonadal soma-derived factor involvement in *Monopterus albus* (protogynous rice field eel) sex change [J]. *Mol Biol Rep*, 2016, 43 (7): 629-637.