

# 线纹海马的性别特异分子标记的开发及鉴定

杨子涵, 贾彬茜, 孙金辉, 马菁菁, 范倩茹, 杨燕菁\*

天津农学院水产学院, 天津

收稿日期: 2024年5月23日; 录用日期: 2024年6月12日; 发布日期: 2024年6月21日

## 摘要

性别特异分子标记的筛选是分子辅助单性育种的重要技术手段。本研究基于雌雄各20尾线纹海马的2b-RAD测序数据, 比较分析并筛选出一个雄性特异的tag scaffold63和一个性别二态的SNP位点QSNP63, 并在大规模群体中进行了验证。PCR扩增显示在108尾海马中scaffold63 tag仅在雄海马中检测到, 而在雌海马中未检测出目的片段; 108只海马中QSNP63位点测序显示所有雌性个体中该位点为G/G纯合, 所有雄性个体中该位点呈现G/T杂合状态。基因注释发现tag scaffold63位于*cilia- and flagella-associated protein 69-like25*号外显子后的内含子上, QSNP63位于*leucine-rich repeats and IQ motif containing 1*基因8号外显子上。综上, 本研究筛选到的线纹海马性别特异分子标记及候选基因为进一步解析线纹海马的性别决定机制奠定了基础。

## 关键词

线纹海马, 分子标记, SNP, 性别决定, 2b-RAD

# Development and Identification of Sex-Specific Molecular Markers in *Hippocampus erectus*

Zihan Yang, Chengqian Jia, Jinhui Sun, Jingjing Ma, Qianru Fan, Yanjing Yang\*

College of Fisheries, Tianjin Agricultural University, Tianjin

Received: May 23<sup>rd</sup>, 2024; accepted: Jun. 12<sup>th</sup>, 2024; published: Jun. 21<sup>st</sup>, 2024

## Abstract

Screening of sex-specific molecular markers is an important technique for breeding of mono-sex

\*通讯作者。

文章引用: 杨子涵, 贾彬茜, 孙金辉, 马菁菁, 范倩茹, 杨燕菁. 线纹海马的性别特异分子标记的开发及鉴定[J]. 水产研究, 2024, 11(2): 49-55. DOI: 10.12677/ojfr.2024.112006

population. Based on the 2b-RAD sequencing data of 20 males and 20 females of *Hippocampus erectus*, we screened and verified a male-specific tag scaffold63 and a sex-dimorphic SNP site QSNP63 in a large-scale population. In 108 *Hippocampus erectus*, scaffold63 tag was only detected in males but not in females via PCR amplification. Sequencing of QSNP63 site showed nsSNPs with homozygous (G/G) in females and heterozygous (G/T) in males. Gene annotation revealed that scaffold63 tag located on the intron behind Exon 25 of *cilia- and flagella-associated protein 69-like*, QSNP63 located on Exon 8 of the *leucine-rich repeats and IQ motif containing 1*. In conclusion, the sex-specific molecular markers and candidate genes screened in this study offer novel insights into the sex-determination mechanisms of the *Hippocampus erectus*.

## Keywords

*Hippocampus erectus*, Molecular Marker, SNP, Sex-Determination, 2b-RAD

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

线纹海马(*Hippocampus erectus*), 属硬骨鱼纲刺鱼目海龙科的小型海洋底栖鱼, 以小型甲壳类动物为食, 具有雄性海马孕育后代的特征[1]。近年来由于海马较高的观赏价值和药用价值使其需求量大幅上升, 优良品种的选育和人工高产养殖已成为海马养殖中急需解决的难题[2]。

线纹海马表现出显著的性别二态性, 性成熟的雄海马在体长、体重、免疫力及所含活性物质方面均优于雌性海马[3][4], 因此培育全雄群体对提高海马养殖效益具有十分重要的意义。

鱼类性别发育通常由遗传因子和环境因素相互作用调控, 具有较高的可塑性[5], 其中, 外源性激素影响鱼类性别决定的报道尤为普遍, 自上世纪 50 年代 Yamamoto [6][7]等通过性激素处理在青鳉中获得了性反转的雌鱼或雄鱼, 外源性激素处理技术便被广泛用于鱼类性别转换的研究。性别特异分子标记联合激素处理是培育单性群体的重要技术手段[8], 近年来我国学者应用此技术在有性别异形显著的鱼类中培育了一批优良单性品系, 例如在通过黄颡鱼特异性别分子标记联合 EE2 性控技术得到 XY 伪雌鱼的基础上, 培育的黄颡鱼“全雄 1 号”、“全雄 2 号”[9]; 在 17 $\alpha$ -甲基睾酮处理联合翘嘴鲌的性别分子标记得到 XX 伪雄鱼的基础上, 培育的全雌翘嘴鲌“鼎鲌 1 号”[10], 在 17 $\alpha$ -甲基睾酮处理联合散鳞镜鲤的性别分子标记得到 XX 伪雄鱼的基础上, 培育的“全雌鲤”; 在雌性化激素(E2、EE2 和己烯雌酚)处理联合斑鳢、乌鳢性别分子标记得到伪雌斑鳢的基础上, 培育得到的全雄乌斑杂交鳢“雄鳢 1 号”等[11], 然而, 海马中尚未有此类性控技术的应用研究。线纹海马在性腺刚开始分化的敏感期, 无法从外观判断其性别, 雄性线纹海马出生 45 天后才开始逐步出现育儿袋, 此时已完成了性腺的定向分化[12], 故筛选线纹海马的性别分子标记是培育全雄海马的基础。

2B-RAD 技术是通过 II B 型限制性核酸内切酶片段化基因组 DNA 后进行的高通量测序技术, 使用该技术具有较高的分型精确度, 涵盖面广, 可获得更多的标记数目[13], 目前利用该技术辅助性别鉴定已在若干水产动物中得到成功应用, 如光棘球海胆(*Mesocentrotus nudus*) [14]、虾夷马粪海胆(*Strongylocentrotus intermedius*) [15]、大刺鲀(*Mastacembelus armatus*) [16]、穴青蟹(*Scylla paramamosain*) [17]、乌苏拟鲃(*Pseudobagrus ussuriensis*) [18]、丝尾鳢(*Mystus wyckioides*) [19]等, 但鲜有关于海马性别特异分子标记的报道。

本实验基于我们前期对雌雄各 20 尾海马进行 2b-RAD 测序的基础, 筛选出了一个雄性特异的 tag scaffold63 和一个呈性别二态性的 SNP QSNP63, 并在 108 尾海马中对其特异性进行了大规模验证和注释分析, 该研究为线纹海马的性控育种奠定了基础。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 试验动物与取材

实验所用的 108 只海马选自三个不同地理区域的养殖场, 分别为中国福建 27 雄和 27 雌(A 组)、山东 9 雄 9 雌(B 组)和海南 18 雄 18 雌(C 组), 暂养水温为 26°C, 海水盐度为 35‰, 光照为 3000, 光照周期 12 个小时, 以冰冻糠虾一天投喂两次, 喂食后大约一个小时进行清理缸内残渣。

取样前用 MS-222 麻醉剂(100 mg/L)对所有待取样的海马进行了麻醉。取线纹海马背部肌肉组织, 于液氮中进行速冻后放入-80°C 冰箱中备用。

### 2.2. 基因组 DNA 制备

使用 Wizard<sup>®</sup>基因组 DNA 纯化试剂盒(Promega, Madison, USA)提取线纹海马基因组 DNA, 通过琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop 2000 紫外分光光度计(Thermo Fisher Scientific)对抽提的 DNA 质量和浓度进行检测。DNA 产物置于-20°C 保存备用。

### 2.3. 性别特异分子标记的验证

我们将 2b-RAD 测序数据所筛选得到的 unique 标签与参考基因组相比较, 从中筛选出了一个差异片段 scaffold63 (表 1)和一个具有性别二态性的 SNP 位点 QSNP63 (表 2), 为了验证所筛选出的性别特异标签的准确性, 提取了该分子标记上下游 2000 bp 的序列, 用 primer3 4.0 (<https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>)进行了特异性引物设计, 引物序列见表 1 和表 2。

**Table 1.** Primers for candidate specific label validation

**表 1.** 候选特异标签验证的引物

性别特异标签 ID	序列	特异性	引物名称	引物序列	温度(°C)	是否有参
scaffold63 (653551-653577)	TGGGGCGG	♂	S63 F	GCGGAGTTTG	62°C	No
	AGTTTTCGTT GTTAGTGG		S63 R	CGTTGTAGT AAGTAACCCC CACACAATGC		

**Table 2.** Sex-specific SNP information

**表 2.** 性别特异 SNP 信息

参考基因组中的位置	SNP 位置	雌性	雄性	引物(5'-3')
Scaffold63	152017	G/G	G/T	F:GAAAAGTGAGGAGCAAAGGA R:AACAGGACTTCAGTGGCATAC

PCR 反应使用 TaKaRa Taq<sup>™</sup> (TaKaRa, 日本东京)进行, 总体积为 20 μl, 其中包含 2 μl 10 × PCR 缓冲液(不含 Mg<sup>2+</sup>)、1.2 μl 25 mM MgCl<sub>2</sub>、1.6 μl dNTP 混合液、0.1 μl TaKaRa Taq (5 U/μl)、1 μl 正向和反向引物(10 mM)、1 μl (约 50 ng/μl)模板 DNA 和 13.6 μl 无菌水。PCR 扩增程序如下: 94°C 变性 3 分钟; 34 个循环: 94°C 30 秒, 62°C 30 秒, 72°C 30 秒; 72°C 延伸 5 分钟。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测并对相应条带进行测序。

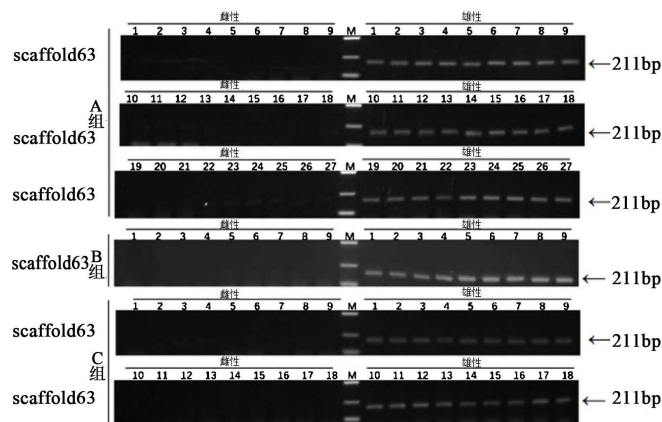
## 2.4. 性别特异序列的注释

使用 Ttools 软件提取特异性标记上下游 2 kb 的序列,通 BLASTn 和 GenBank 进行序列注释,用 IBS Illustration 进行模式图绘制,用 Expasy 和 DNAMAN8 对氨基酸序列进行比对分析。

## 3. 结果与分析

### 3.1. 雄性特异 scaffold63 序列的验证

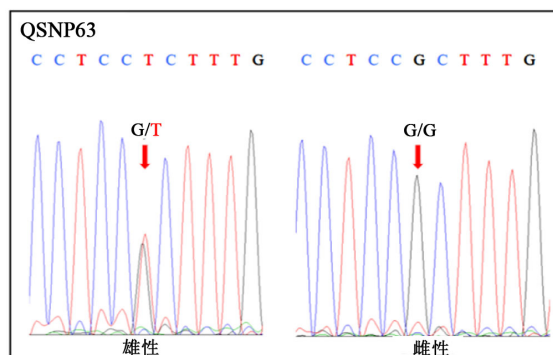
对来自三个不同地理区域的 108 只雌雄线纹海马的基因组 DNA 用 scaffold63 tag 的特异性引物进行片段扩增。结果显示三个地区的所有雄海马中均扩增到一条大小为 211 bp 的目的条带,而在雌海马中没有扩增到相应的目的条带。证实 scaffold63 tag 特异性存在于雄海马的基因组中,可作为鉴定线纹海马遗传性别的特异分子标记(如图 1)。



**Figure 1.** Electropherogram for scaffold63 tag in 108 *Hippocampus erectus*  
**图 1.** scaffold63 tag 在 108 只线纹海马中的扩增电泳图

### 3.2. QSNP63 位点的性别二态性验证

通过表 2 中的特异性引物对 QSNP63 位点所在片段进行 pcr 扩增并送测序,结果显示, QSNP63 位点在所有雄海马中的测序均呈现双峰,对应的碱基类型为 G/T 杂合型,而在所有雌性中 QSNP63 位点的测序均呈现单峰,对应的碱基类型为 G/G 纯合型(图 2),该结果证实 QSNP63 位点在线纹海马中呈现雌性纯合雄性杂合的二态性。



**Figure 2.** The sequencing peaks of QSNP63 in the male and female *Hippocampus erectus*  
**图 2.** QSNP63 在雌雄线纹海马序列中的测序峰图

### 3.3. scaffold63 tag 及 QSNP63 所在序列的注释

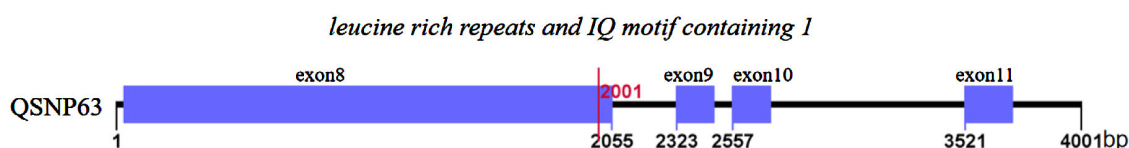
通过 BLAST 和 GENE BANK 对 scaffold63 tag 和 QSNP63 所在位置的上下游各 2 kb 的序列进行搜索比对, 结果显示 scaffold63 tag 位于 *cilia- and flagella-associated protein 69-like* 的第 25 个外显子后的内含子上(图 3), 不编码氨基酸; QSNP63 位于 *leucine-rich repeats and IQ motif containing 1* 基因第 8 个外显子上(图 4), 对其氨基酸进行比对发现其在雌海马中对应编码精氨酸(R), 而在雄海马中呈精氨酸(R)和亮氨酸(L)两种多态性。



注: scaffold63tag 用红色框标出。外显子用绿色框表示。内含子用横线表示。外显子和内含子起始终止位置用 bp 表示。

Figure 3. Gene annotation map of scaffold63

图 3. scaffold63 的基因注释图



注: QSNP63 位点用红线标出。外显子用蓝紫色框表示。内含子用横线表示。外显子和内含子起始终止位置用 bp 表示。

Figure 4. Gene annotation map of QSNP63

图 4. QSNP63 的基因注释图

## 4. 讨论

性别特异分子标记是培育单性群体的重要基础, 尤其在经济性状上呈现性别二态性的品种中得到了广泛应用, 如基于雌、雄生长异性及个体大小差异开发的单性养殖品种黄颡鱼“全雄 1 号”, 全雌“北鲆 2 号”和全雄罗非鱼“鹭雄 1 号”等[20] [21]。2b-RAD 测序技术在筛选性别特异分子标记方面展现出巨大潜力, 具有分型准确率高、建库快捷简便和成本易控制等优点[13]。因此, 本实验基于 2b-RAD 对雌雄线纹海马进行测序等基础上, 对所筛选到的 scaffold63 tag 和 QSNP63 进行了验证和注释, 开发出 2 个可鉴别线纹海马性别的分子标记, 为后续培育经济效益优于雌海马的全雄海马群体奠定了基础。

Scaffold63 tag 的注释显示其位于 *cilia- and flagella-associated protein 69-like* 的第 25 个外显子后的内含子上, 其在精子鞭毛结构中扮演着重要角色[22], 尽管 scaffold63 tag 其对 *cilia- and flagella-associated protein 69-like* 的影响低于 CDS 区域和基因调控区域上的 SNP 位点, 但亦可能通过影响其剪接改变序列, 该猜测需进一步验证。

QSNP63 位于 *leucine-rich repeats and IQ motif containing 1* 基因的第 8 个外显子上, 该 SNP 为 CDS 区域的非同义编码 SNP, 在雌海马中其对应的氨基酸为精氨酸(R), 而在雄海马中该呈精氨酸(R)和亮氨酸(L)杂合态。研究表明在人类、小鼠和鸡中 *leucine-rich repeats and IQ motif containing 1* 对精子的发生及精子活力的维持具有重要的作用[23] [24] [25], 有趣的是我们在 QSNP63 下游约 153 bp 的位置还发现了另外一个雌海马纯合雄海马杂合的 SNP 位点[26], SNP 的多态是否从剂量上导致了 *leucine-rich repeats and IQ motif containing 1* 蛋白结构和功能上的变化以及 *leucine-rich repeats and IQ motif containing 1* 是否是线

纹海马性别调控候选基因的问题仍需进一步研究。

## 5. 结论

基于对雌雄线纹海马的 2b-RAD 测序,我们对候选的两个性别特异分子标记 Scaffold63 tag 和 QSNP63 进行了大规模验证和注释,该研究为线纹海马的性别鉴定提供了一种简便的方法,为后续培育全雄海马群体奠定了基础。

## 基金项目

本研究受大学生创新创业训练计划“线纹海马性别特异分子标记的筛选及相关基因的表达分析”项目(202110061081)资助。

## 参考文献

- [1] 黄佳欣. 线纹海马对关键饵料及环境因子的分子响应特征研究[D]: [硕士学位论文]. 天津: 天津农学院, 2020.
- [2] 韩松霖. 中国海马的分类、资源、利用与保护[D]: [硕士学位论文]. 桂林: 广西师范大学, 2013.
- [3] 秦耿. 美国线纹海马(*Hippocampus erectus*)性腺发育及个体生长研究[D]: [硕士学位论文]. 北京: 中科院研究生院, 2012.
- [4] Lin, T., Zhang, D., Liu, X. and Xiao, D. (2016) Parental Care Improves Immunity in the Seahorse (*Hippocampus erectus*). *Fish & Shellfish Immunology*, **58**, 554-562. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.09.065>
- [5] Devlin, R.H. and Nagahama, Y. (2002) Sex Determination and Sex Differentiation in Fish: An Overview of Genetic, Physiological, and Environmental Influences. *Aquaculture*, **208**, 191-364. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00057-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00057-1)
- [6] Yamamoto, T. (1953) Artificially Induced Sex-Reversal in Genotypic Males of the Medaka (*Oryzias latipes*). *Journal of Experimental Zoology*, **123**, 571-594. <https://doi.org/10.1002/jez.1401230309>
- [7] Yamamoto, T.O. (1958) Artificial Induction of Functional Sex-Reversal in Genotypic Females of the Medaka (*Oryziaslatipes*). *Journal of Experimental Zoology*, **137**, 227-263.
- [8] Dan, C., Mei, J., Wang, D. and Gui, J. (2013) Genetic Differentiation and Efficient Sex-Specific Marker Development of a Pair of Y- and X-Linked Markers in Yellow Catfish. *International Journal of Biological Sciences*, **9**, 1043-1049. <https://doi.org/10.7150/ijbs.7203>
- [9] Liu, H., Guan, B., Xu, J., Hou, C., Tian, H. and Chen, H. (2012) Genetic Manipulation of Sex Ratio for the Large-Scale Breeding of YY Super-Male and XY All-Male Yellow Catfish (*Pelteobagrus fulvidraco* (Richardson)). *Marine Biotechnology*, **15**, 321-328. <https://doi.org/10.1007/s10126-012-9487-7>
- [10] Han, C., Zhu, Q., Lu, H., Wang, C., Zhou, X., Peng, C., *et al.* (2020) Screening and Characterization of Sex-Specific Markers Developed by a Simple NGS Method in Mandarin Fish (*Siniperca chuatsi*). *Aquaculture*, **527**, Article ID: 735495. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735495>
- [11] Zhao, J., Ou, M., Wang, Y., Liu, H., Luo, Q., Zhu, X., *et al.* (2021) Breeding of YY Super-Male of Blotched Snakehead (*Channa maculata*) and Production of All-Male Hybrid (*Channa argus* ♀ × *C. maculata* ♂). *Aquaculture*, **538**, Article ID: 736450. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736450>
- [12] 陈美玲, 符宏高, 吴锐琼, 等. 线纹海马早期性腺发育的组织学形态分析[J]. 福建师范大学学报: 自然科学版, 2022, 38(6): 69-73.
- [13] Wang, S., Meyer, E., McKay, J.K. and Matz, M.V. (2012) 2b-RAD: A Simple and Flexible Method for Genome-Wide Genotyping. *Nature Methods*, **9**, 808-810. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2023>
- [14] Cui, Z., Zhang, J., Sun, Z., Liu, B., Zhao, C. and Chang, Y. (2021) Identification of Sex-Specific Markers through 2b-RAD Sequencing in the Sea Urchin (*Mesocentrotus nudus*). *Frontiers in Genetics*, **12**, Article ID: 717538. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.717538>
- [15] Han, Y., Sun, Z., Chang, S., Wen, B., Song, J., Zuo, R., *et al.* (2021) Application of SNP in Genetic Sex Identification and Effect of Estradiol on Gene Expression of Sex-Related Genes in *Strongylocentrotus intermedicus*. *Frontiers in Endocrinology*, **12**, Article ID: 756530. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.756530>
- [16] Xue, L., Guo, X., Zhou, Y., Wang, Z., Fan, H., Li, D., *et al.* (2020) Screening and Characterization of Sex-Specific Markers by 2b-RAD Sequencing in Zig-Zag Eel (*Mastacembelus armatus*) with Implication of XY Sex Determination

- System. *Aquaculture*, **528**, Article ID: 735550. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735550>
- [17] Shi, X., Waiho, K., Li, X., Ikhwanuddin, M., Miao, G., Lin, F., *et al.* (2018) Female-Specific SNP Markers Provide Insights into a WZ/ZZ Sex Determination System for Mud Crabs *Scylla Paramamosain*, *S. tranquebarica* and *S. serrata* with a Rapid Method for Genetic Sex Identification. *BMC Genomics*, **19**, Article No. 981. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5380-8>
- [18] Zhu, C., Liu, H., Cheng, L., Pan, Z., Chang, G., Wu, N., *et al.* (2021) Identification of Sex-Specific Sequences through 2b-RAD Sequencing in *Pseudobagrus ussuriensis*. *Aquaculture*, **539**, Article ID: 736639. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736639>
- [19] Zhou, Y., Wu, J., Wang, Z., Li, G., Mei, J., Zhou, L., *et al.* (2019) Identification of Sex-Specific Markers and Heterogametic XX/XY Sex Determination System by 2b-RAD Sequencing in Redtail Catfish (*MYSTUS wyckioides*). *Aquaculture Research*, **50**, 2251-2266. <https://doi.org/10.1111/are.14106>
- [20] Mei, J. and Gui, J. (2015) Genetic Basis and Biotechnological Manipulation of Sexual Dimorphism and Sex Determination in Fish. *Science China Life Sciences*, **58**, 124-136. <https://doi.org/10.1007/s11427-014-4797-9>
- [21] Gong, G., Xiong, Y., Xiao, S., Li, X., Huang, P., Liao, Q., *et al.* (2022) Origin and Chromatin Remodeling of Young X/Y Sex Chromosomes in Catfish with Sexual Plasticity. *National Science Review*, **10**, nwac239. <https://doi.org/10.1093/nsr/nwac239>
- [22] Qu, R., Zhang, Z., Wu, L., Li, Q., Mu, J., Zhao, L., *et al.* (2023) ADGB Variants Cause Asthenozoospermia and Male Infertility. *Human Genetics*, **142**, 735-748. <https://doi.org/10.1007/s00439-023-02546-0>
- [23] Sato, Y., Tajima, A., Kiguchi, M., Kogusuri, S., Fujii, A., Sato, T., *et al.* (2020) Genome-Wide Association Study of Semen Volume, Sperm Concentration, Testis Size, and Plasma Inhibin B Levels. *Journal of Human Genetics*, **65**, 683-691. <https://doi.org/10.1038/s10038-020-0757-3>
- [24] Fukutomi, M., Uedono, C., Fujii, A. and Sato, Y. (2022) Lrr1q1 Is an Essential Factor for Fertility by Suppressing Apoptosis. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, **39**, 2647-2657.
- [25] Xing, K., Chen, Y., Wang, L., Lv, X., Li, Z., Qi, X., *et al.* (2022) Epididymal Mrna and Mirna Transcriptome Analyses Reveal Important Genes and miRNAs Related to Sperm Motility in Roosters. *Poultry Science*, **101**, Article ID: 101558. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101558>
- [26] Yang, Y., Jia, C., Ma, J., Cui, P., Tu, D., Wang, S., *et al.* (2024) Identification of Male-Specific Markers by 2b-RAD Sequencing Reveals an XX/XY Sex-Determination System in Cultured Lined Seahorse, *Hippocampus Erectus*. *Aquaculture*, **578**, Article ID: 740084. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.740084>