

年青性染色体及鉴定方法

楚张卿^{1,2#}, 罗玮^{3#}, 夏云^{1*}

(1. 中国科学院成都生物研究所,成都610041; 2. 中国科学院大学,北京100049;
3. 绵阳师范学院生态安全与保护四川省重点实验室,四川绵阳621000)

摘要: 性染色体进化及性别决定机制是脊椎动物进化研究的热点,近些年更是提出了性别组学的概念。脊椎动物各类群的性别决定机制呈现出多种形式,尤其是具有年青性染色体系统的类群的演化模式更为多样。由于年青性染色体在核型形态上差异不大,传统的研究方法难以识别,因此本文从细胞遗传学方法、性染色体上的DNA序列/RNA序列及其表达、蛋白质表达等多个维度阐述了年青性染色体和性别决定系统的鉴定方法。在高通量测序技术的基础上结合基因组学、蛋白质组学和代谢组学对性别决定系统进行更深层次的研究,从而形成性别组学,并最终解答性别决定的方式多样性及其背后的进化动力和分子途径。

关键词: 年青性染色体; 性别决定; 性别连锁标记; 性染色体转换; 脊椎动物

中图分类号: Q343. 2; Q959. 3 文献标志码: A 文章编号: 1000 – 7083(2022)04 – 0462 – 11

Identification Method of Nascent Sex Chromosomes

CHU Zhangqing^{1,2#}, LUO Wei^{3#}, XIA Yun^{1*}

(1. Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China;
2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Ecological Security and Protection Key Laboratory of Sichuan Province, Mianyang Normal University, Mianyang, Sichuan Province 621000, China)

Abstract: Sex chromosome evolution and sex determination mechanism has always been the intriguing aspect in vertebrate evolution research. In recent years, the concept of sexomics has been put forward. The sex determination mechanisms vary in vertebrates, especially, the species with nascent sex chromosome have more diverse evolutionary patterns. However, it is hard to distinguish the karyotype of nascent sex chromosome using traditional methods. This article illustrated the identification of sex-linked molecular markers and the decision scheme of sex determination system through multiple dimensions, such as cytogenetic approach, DNA sequence in sex chromosome, the expression of RNA sequence, protein expression and so on. The future research will head toward the formation of sexomics by conducting a deeper research on sex determination system based on high-throughput sequencing combined with genomics, proteomics and metabolomics. It is proposed that more model organisms and the evolutionary forces and molecular pathways underlying the evolution of sex determination will be found out.

Keywords: nascent sex chromosome; sex determination; sex-linked marker; sex chromosome transitions; vertebrate

收稿日期: 2021-08-19 接受日期: 2022-05-09

基金项目: 中国科学院青年创新促进会项目(2019362); 第二次青藏高原综合科学考察研究(2019QZKK0501)

作者简介: 楚张卿(1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 动物学, E-mail: chuzhang_qing@163.com; 罗玮(1990—), 男, 博士, 研究方向: 动物学, E-mail: luoweihuyao@163.com # 同等贡献作者

* 通信作者 Corresponding author, E-mail: xiayun@cib.ac.cn

脊椎动物的性别决定机制一般可以分为2种,即遗传性别决定和环境性别决定(Marshall, 2008)。哺乳动物和鸟类的性别是遗传性别决定型且性染色体对高度异形化,如哺乳动物的性别决定系统是XX/XY型,即雄性异配,该系统中Y染色体高度退化;而鸟类的性别决定系统为ZZ/ZW型,即雌性异配,且W染色体高度退化。不同于哺乳动物和鸟类中高度异形化的性染色体,冷血脊椎动物鱼类、两栖类以及爬行类中大部分物种的性染色体在形态上既无太大差异,也未发生显著的分化(Hillis & Green, 1990; Schmid & Steinlein, 2001; Devlin & Nagahama, 2002; Eggert, 2004)。这种分化程度较低的性染色体被称为“年青性染色体”,即在性染色体分化后相当长的一段时间里,染色体形态及基因容量并无明显变化。

经典的性染色体分化模型认为,性染色体通常是由常染色体进化而来,常染色体对中的1条染色体因突变在偶然间获得了性别决定基因,如 *Sry*、*Sox* 或 *Dmrt* 等(Charlesworth *et al.*, 2005; Bachtrog *et al.*, 2011; Bellott *et al.*, 2014),该常染色体对就具备了一定的性别决定功能,被称为原始的性染色体(Beukeboom & Perrin, 2014),该基因及其周围的部分区域之间的重组开始受到抑制,即重组抑制,以此来保护原始性染色体上的性别决定区域(Graves, 2006)。随后性别拮抗基因在性别决定区域周围聚集,导致重组抑制区域沿着Y/W染色体逐渐扩大(Charlesworth *et al.*, 2005),同时丢弃大量的无功能基因,并最终演变为形态上高度分化的异态形性染色体对(Bachtrog, 2006, 2013),如哺乳动物和鸟类中常见的高度异形化的Y或W染色体。因此重组抑制是性染色体分化的第一个阶段,也是最关键的一个阶段(Rice, 1987),并随着其周围的性别拮抗基因和性别决定基因遗传给下一代。

经典的性染色体分化模型是从模式生物中的稳定且高度分化的性染色体对形成的模式提出的,如哺乳动物、果蝇等,但与哺乳动物和鸟类中高度分化的性染色体相比,鱼类、两栖类以及爬行

类中大部分物种的性染色体的形态差异不大(Hillis & Green, 1990; Schmid & Steinlein, 2001; Devlin & Nagahama, 2002; Eggert, 2004)。而且性别决定系统或性染色体在这些类群中的不同科、属之间也存在差异,甚至在同一物种的不同地理种群中也不同(Ogata *et al.*, 2003; Tanaka *et al.*, 2007)。虽然有关鱼类、两栖类以及爬行类性染色体和性别决定的研究已经很多,但大多都集中于性染色体容易辨别的类群。由于年青性染色体在形态上难以识别,拥有这一类性染色体的非模式物种的性别决定和性染色体研究仍有许多未解之谜,但随着技术的发展(如高通量测序技术),关于年青性染色体研究也逐渐成为性染色体研究的热点,为性染色体进化提供了更全面的材料。

1 年青性染色体

经典性染色体进化假说,从提出到现在一直统治着整个性染色体进化的理论研究,该假说的确在少数特化类群中得到了很好的验证,如鸟类和哺乳动物,同时也引发了有关“性染色体生来就是要被毁灭的”世纪大讨论(Aitken & Marshall, 2002; Steinemann & Steinemann, 2005)。但随着染色体研究技术的不断突破以及对大量非模式物种的研究,研究者发现绝大多数具有年青同形性染色体(Vicoso & Bachtrog, 2013)的物种中有大量未发生退化的同形性染色体。例如,鱼类中90%物种的性染色体(Devlin & Nagahama, 2002)、两栖类中96%物种的性染色体为同形染色体(Hillis & Green, 1990; Schmid & Steinlein, 2001; Eggert, 2004)。目前,对于这种年青性染色体普遍存在现象的解释,主要有性染色体“高频转换”假说和“不老泉”假说。比较基因组研究表明,性染色体在基因组中的位置往往是不稳定的,且经常在染色体之间发生转换(Bachtrog *et al.*, 2014)。因而,推测同形性染色体之间的高频转换才是性染色体进化的常态,而当性染色体对之间的分化偶然超过某个阈值时,会掉入进化陷阱,这种情形下,性染色

体的转换将被终止,性染色体继续退化而最终异形化(图1)(Abbott *et al.*, 2017; Vicoso, 2019)。因此,有学者提出,性染色体长期处于一种快速的新旧替换状态,没有足够的时间走向退化,从而维持其形态不变,保持着不断更新的“年青”状态(Volff *et al.*, 2007; Vicoso, 2019)。对多个支系进行的比较基因组学显示,一些演化支系的确已经发生了频繁的性染色体转换事件,包括两栖类(Hillis & Green, 1990; Jeffries *et al.*, 2018)、爬行类(Gamble *et al.*, 2015)和鱼类(Myosho *et al.*, 2015)。Gamble 等(2015)在 12 种壁虎中发现了 17~24 次的性别决定系统的转化。Hillis 和 Green(1990)通过对 63 种蛙和蝾螈的性别决定系统类型分析,揭示了在两栖动物系统发育史上,性别发育系统从祖先的雌性异配型系统转换为雄性异配型系统,至少发生了 8 次转换。Jeffries 等(2018)对蛙科 Raniidae 中的 28 个物种性别决定系统的研究,发现了至少 13 次性别决定系统转换事件,其中 11 次是 XY 与 XY 之间的转换。Roco 等(2015)在热带爪蟾 *Xenopus tropicalis* 中曾发现了至少 3 种性染色体,且第三种性染色体处于过渡形态,存在于 2 个性别决定系统之间(Schartl, 2015)。Miura 等(2016)观察到,转换现象在粗皮蛙 *Glandirana rugosa* 中也曾多次发生,因为在该物种中,同时存在 XX/XY 和 ZZ/ZW 2 种性别决定系统。

另一种假说是由 Perrin(2009)提出的“不老泉”假说,该假说认为性反转个体中性染色体的偶然重组事件,维持着性染色体的同形状态。即使性染色体没有在异配性别中重组(如 XY 雄性),它们也可能在性反转个体(如 XY 雌性)中重组,因为重组模式取决于表型而不是基因型性别(Kondo *et al.*, 2001; Lynn *et al.*, 2005; Campos-Ramos *et al.*, 2009; Matsuba *et al.*, 2010)。Stöck 等(2011)对 3 种近缘的欧洲雨蛙(*Hyla arborea*、*H. intermedia*、*H. molleri*)的研究发现,这 3 个物种都具有相同的同态形性染色体对,在雄性中完全不存在 X-Y 重组。尽管如此,X 染色体和 Y 染色体之间的性别连

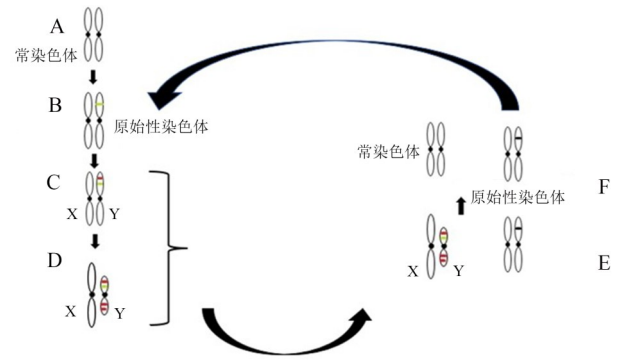


图1 性染色体形成的主流理论模型及性染色体转换 (参考 Abbott 等, 2017)

Fig. 1 The classical theoretical model of sex chromosome formation and sex chromosome transitions (referring to Abbott *et al.*, 2017)

A. 性染色体起源于 1 对常染色体; B. 其中 Y 染色体获得性别决定基因(绿色), 形成原始性染色体; C. 由于性别拮抗选择, 原始性染色体上性别决定位点周围的重组受到抑制, 并积累性别相关基因(红色); D. 性染色体间逐渐分化, Y 染色体获得更多性别相关基因并失去无关的基因, 最终出现 Y 染色体退化; E. 在一些类群中, 会出现性染色体的转换, 另一条染色体获得新的性别决定基因(黑色); F. 这条有新的性别决定基因的染色体又演化为新的原始性染色体, 而老的性染色体失去 Y 染色体, 并且 X 染色体由于减数分裂的不正常配对而成为二倍体并最终成为常染色体, 新的原始性染色体又将继续进行性染色体分化的循环

A. sex chromosomes originate from a pair of autosomes; B. one chromosome Y obtains sex determining gene (green) to form proto-sex chromosomes; C. due to sex antagonistic selection, recombination around sex determination sites on proto-sex chromosomes is inhibited and sex related genes (red) are accumulated; D. sex chromosomes gradually differentiate, chromosome Y obtained more sex related genes and lost irrelevant genes and finally chromosome Y degenerates; E. in some groups, sex chromosome turnover occurs, a new sex determining gene (black) was obtained on another chromosome; F. this chromosome with a new sex determining gene evolved into a new proto-sex chromosome, while the old sex chromosome lost chromosome Y, and chromosome X becomes diploid and eventually autosomal due to abnormal pairing in meiosis, the new proto-sex chromosomes will continue the cycle of sex chromosome differentiation

锁位点序列并没有显示出差异。在系统发育分析中, X 和 Y 等位基因是根据物种聚集的, 而不是按配子进行聚类。因此推测这些树蛙的性染色体同态不是高频转换造成的, 而是通过偶然的 X-Y 重组保持性染色体形态上的稳定。Stöck 等(2013)在 4 种蟾蜍(*Bufo siculus*、*B. shaartusiensis*、*B. turanensis*、*B. balearicus*)中也发现了相同的性染色体偶然

重组模式。

2 年青性别决定系统及性染色体的鉴定

对于性染色体分化程度高的物种来说,可以通过常规的核型分析鉴定性染色体和性别决定系统(李树深,胡健生,1999)。核型上的差异包括染色体数目差异(如XO)、染色体长度的差异、着丝粒位置差异、染色体长臂和短臂比值差异、甚至次缢痕差异等。与哺乳动物高度异化的性染色体不同,绝大多数的鱼类和两栖类存在年青性染色体,其在形态上的分化程度很低(即同形的性染色体)(Miura,2017),传统的细胞遗传学方法难以从核型形态上进行区分,仅部分可以通过G-带、C-带、Ag-NORs以及R-带等带型识别。这些带型反映了性染色体分化的程度,在部分物种中呈现两性差异,从而鉴定出同形性染色体(王子淑等,1983;李树深,胡健生,1996;张加一,谷晓明,1997)。但基于细胞遗传学的带型制作过程繁琐,结果准确率不高。

除了传统的带型分析以外,由于在性别决定区域存在序列差异,以及雌雄之间在基因表达层面也存在差异,多种基于高通量测序的方法也可用于判断性别决定系统和性染色体,分别是(1)基于DNA/RNA序列差异;(2)基于RNA表达差异;(3)基于蛋白质表达产物差异以及基于蛋白质组和代谢组之间的差异进行筛选区分。这些新兴的技术并不基于性染色体是否异形,大大提高了鉴定年青性染色体的效率。

2.1 比较DNA/RNA分子序列方法

高通量测序技术,包括DNA和RNA测序,已被大量用于性别连锁分子标记筛选和性别决定系统的鉴定。目前运用该技术已开发出大量的特异性分子标记,进行性别决定系统及性染色体的鉴定(Palmer *et al.*,2019)。

2.1.1 基于分子标记 通过筛选含有多态性的微卫星位点,再将多个雌雄个体进行等位基因分型,若雌雄含有不同的等位基因,则为性别连锁位点。在对罗非鱼 *Oreochromis mossambicus* 的研究

中,发现了6个与性别相关的微卫星位点,可用于性别的鉴定(陈文伟等,2020)。在棘腹蛙 *Quasipaa boulengeri* 中,通过微卫星探针技术辨别染色体,不仅取得了良好效果,也为遗传多态性的研究奠定了基础(常晓媛等,2013)。Yuan等(2017)利用1个性别特异性微卫星标记寻找棘腹蛙中的雄性异配子的同源模式,从而有助于解释性别决定系统和性染色体的进化。

扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)是一种检测DNA多态性的方法,通过限制性内切酶将基因组分解为大小不同的DNA片段,再对其进行PCR扩增,如在雌雄中出现不同的多态性,则为性别连锁标记。在研究香鱼 *Plecoglossus altivelis* 养殖群体的遗传多样性时,通过AFLP标记技术对其进行性别特异性分子标记的筛选,最终筛选出1条雄性特异性分子标记的序列(闫松松等,2014)。刘雪清等(2015)尝试在成熟期长,且难以从外部形态鉴定性别的中华鲟 *Acipenser sinensis* 基因组中寻找性别特异性的AFLP分子标记,虽然最后结果并不理想,但这些数据仍为中华鲟性别相关问题的研究奠定了基础。

单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)及插入缺失(In/Del)分子标记具有独特的优势,包括密度高、遗传稳定等。且雌雄个体会固定不同的SNP及In/Del,因此可被用于性别决定系统及性染色体的鉴定。在对中国家养双峰驼 *Camelus bactrianus* 进行研究时,通过在群体间进行Y-SNP多态标记的筛选,发现筛选出的Y染色体特异引物可以用于性别鉴定(陈慧玲,2016)。林晓煜等(2018)曾在大黄鱼 *Larimichthys crocea* 中发现1个雄性特异SNP标记,并以此为基础开发出1种大黄鱼的新型遗传性别鉴定技术。Sun等(2018)针对黄姑鱼 *Nibea albiflora* 的 *Dmrt1* 基因在X和Y染色体上存在的差异设计出特异引物,以此对野生群体和养殖群体的遗传性别进行了鉴定。

2.1.2 基于关联分析 高通量测序出现后,基于关联分析可大批量筛选性别连锁的分子标记,主

要测序分析方法包括全基因组关联分析(genome-wide association study, GWAS)、限制性位点相关 DNA 测序(restriction site-associated DNA sequencing, RAD-seq)、基因分型测序(genotyping-by-sequencing, GBS)以及雌雄分库测序等,这些方法都是针对未退化完全的性连锁区域的序列,通常利用序列在性别间的关联情况来找出与性别关联的分子序列,并由此开发了 RADSex 等筛选软件(Feron *et al.*, 2021)。基于关联分析的方法将雌雄分为 2 组,分析雌雄组间特有的差异,这种差异可以在 SNP、K-mers、Reads 等层面来反映。

Lambert 等(2016)在林蛙 *Rana clamitans* 中通过多样性阵列技术鉴定出 8 个雄性特有性别连锁 SNP,表明该物种为 XX/XY 性别决定系统。Hu 等(2019)为进一步了解大鲵 *Andrias davidianus* 的性别决定机制,利用限制性位点相关 DNA(RAD)测序技术,分离出 1 个性别特异性遗传标记。类似于 RAD-seq 的方法,从 DNA 测序的数据中寻找性别特异的 K-mers 也可以鉴别出性别关联的序列。Duminda 等(2020)基于 K-mer 值对澳大利亚三线石龙子 *Bassiana duperreyi* 的性别连锁序列进行鉴定,共鉴定出 7 个可靠的 Y 染色体特异性标记,表明其为 XX/XY 性别决定系统。Lin 等(2020)在大黄鱼群体中进行了性别测定的 GWAS,最终在 18 号染色体中确定了 1 个与雄性显著关联的 SNP,为大黄鱼性别决定机制的确定奠定了基础。

在对大量样本进行测序时,为了降低测序成本、提高效率,出现了一种新型测序技术——Pool-seq,其测序文库不是由单个个体或细胞的 DNA 制备的,而是由来自不同个体或细胞的 DNA 片段的混合物制备的(Schlötterer *et al.*, 2014)。这种方法在鱼类性别研究中得到了大量应用(Wang T *et al.*, 2019; Wen *et al.*, 2019; Feron *et al.*, 2020)。Zhang 等(2017)在草鱼 *Ctenopharyngodon idellus* 中利用 Pool-seq 鉴定了 5 个 Y-连接的 scaffold(总计 347 kb)、6 个 Y-特异性序列和 14 个 Y 连锁基因,证明了基于新一代测序技术的 DNA 重测序技术在鱼类性别标

记鉴定中的适用性,既为草鱼 Y 染色体的研究奠定了基础,也有助于阐明鲤科 Cyprinidae 鱼类性染色体的进化模式。

2.1.3 基于测序覆盖深度 针对已有基因组测序的物种,采集雌雄个体进行高通量测序或重测序,比较性染色体测序片段的深度可以判断性别连锁的区域和基因片段。XY 系统中常染色体及雌性的 2 个 X 染色体之间有 2 个拷贝,而雄性的 X 染色体和 Y 染色体都只有 1 个拷贝。对基因组测序时,测序深度通常会为基因组大小的数十倍到数百倍。因此,从 Reads 的测序深度来说,如果一个区段雌性比对上的 Reads 比例是雄性的 2 倍,可确定该区域为性别连锁。该方法最早被用在了一些蛇类和鸟类的性染色体的确认和判断中(Vicoso & Bachtrog, 2011; Zhou *et al.*, 2014)。然而,这种方法仅适用于已经分化了足够时间的 Y/W 染色体,这是因为重组抑制积累了大量的变异,使得处于 Y 或 W 染色体上的序列不会被比对到 X 或 Z 染色体上(Charlesworth *et al.*, 2021)。新近分化的性染色体类群分化程度较弱,性染色体(X 与 Y, Z 与 W)之间仍然具有很高的相似性,测序的 Reads 不能特异性地比对到其中一条性染色体上,从而使该方法失效。

2.1.4 基于哈迪-温伯格平衡 利用性染色体形成时重组抑制的特性,还可以利用哈迪-温伯格平衡的原理从种群遗传的角度来鉴定性别决定系统或性染色体。Käfer 等(2021)基于自然种群中已知雌雄个体的等位基因和基因型的频率,利用启发式的概率计算方法(贝叶斯法),通过后验概率来检测性别连锁的基因。该方法比 GWAS 等方法所需的个体数少,每种性别的个体仅需 5~10 个。这种方法也可以使用 RNA-seq、基因组重测序以及 RAD-seq 等的数据,其检测效率取决于染色体重组抑制区域的大小和分化程度。由于该方法最基本的原理是基于哈迪-温伯格平衡,因此理想样本是来自于同一大种群下的随机交配的个体,使用不同种群的标本可能会增加假阳性的风险。

2.1.5 基于遗传图谱 遗传图谱又称遗传连锁图谱,是指基因以及专一的多态性标记之间在基因组中相对位置的图谱,反映了染色体的交换与重组。早期遗传图谱的构建大多是利用显性和共显性标记方法,如 AFLP 和 SSR 标记,但随着下一代测序技术,如 RAD-seq、GBS 等方法的发展,以 SNP 为主要的遗传标记可构建更精细的遗传图谱,且根据此类遗传图谱还可以进行数量性状位点 (quantitative trait locus, QTL) 的检测 (Gonen *et al.*, 2014; Uchino *et al.*, 2018)。因此,通过构建遗传图谱可以确定与性别性状有关的 QTL 位点 (Gao *et al.*, 2020),在大比目鱼 *Hippoglossus hippoglossus* 遗传图谱的辅助下定了其性别控制位点 (Palaiokostas *et al.*, 2013)。Qiu 等 (2018) 构建了 1 个有 8 094 个 SNP 标记的黄姑鱼高密度遗传连锁图谱,并据此定位了 QTL 基因座以及相应区间,在 QTL 区间中鉴定并发现了 124 个性别二型性的候选基因,包括 *Dmrt1*、*Dmrt2* 和 *Dmrt3*。Gao 等 (2020) 利用 GBS 构建了 1 个有 5 705 个 SNP 标记的黄颡鱼 *Pelteobagrus fulvidraco* 高密度遗传连锁图谱,并将其定位到 26 个不同的连锁群,鉴定发现出了 11 个显著的性相关 QTL 基因座,且在 QTL 区间内鉴定出 6 个性别相关基因,研究不仅阐明了黄颡鱼的性别分化过程,且为之后的分子辅助育种奠定了研究基础。

2.1.6 基于序列建树 这是一种通过基因树鉴定性染色体的新方法,即直接利用 DNA/RNA 鉴定。将测得的多个雌雄序列数据分别比对到参考基因组上,并在每条染色体上选取一定大小的窗口片段,将所有雌雄个体的 2 种分型都放在一起建树。如果来自所有雄性的一种分型全聚在一起,并且形成单系,那该基因树所在的片段是性别关联的片段,且反映了 XY 的性别决定系统。如果所有雌性的一种分型序列全聚为一支,则为 ZW 型性别决定系统。该方法首先需要构建 X 和 Y 序列的基因树,由于 X 和 Y 序列之间差异较大,理想状态下, X 和 Y 序列分别是独立的 2 个树,由于序列很多,构建出的基因树也很多,此时哪棵树用分子标

记可以把 X 和 Y 2 个基因树靠拢在一起,即为性别连锁标记,区别不开则不是 (Dixon *et al.*, 2019; Toups *et al.*, 2019)。

2.2 基于 RNA 表达

利用两性之间一些基因在 RNA 表达水平上的差异,进行性别决定与性染色体的相关研究。Shen 等 (2020) 基于 RNA-seq 分析筛选到鲈 *Silurus asotus* 11 个性别特异表达的基因,并使用 qRT-PCR 技术对 11 个基因进行验证,最终确定了 8 个性别特异表达基因。姚汶励等 (2019) 通过转录组测序的方法在草鱼雌雄样本中找到了数千个差异表达基因,最终发现 *Dmrt1*、*amh* 基因和 *Cyp19a1a*、*Foxl2* 基因分别与草鱼早期精巢和卵巢发育调控相关。Qin 等 (2020) 对黄姑鱼性腺组织进行转录组测序,并基于基因表达差异筛选出了与性别相关的基因,即 *Cyp19a* 仅在卵巢中表达,而 *Dmrt1* 仅在精巢中表达。

2.3 基于蛋白质组学和代谢组学

在 20 世纪 80 年代蛋白质组学出现之前,学者普遍进行传统的蛋白质研究,即通过比较两性之间蛋白质的表达差异,从而确定性别决定系统,如同工酶法。Richard (1983) 在 *Rana clamitans* 中发现了一种性连锁酶——乌头酸酶,由于雌雄个体均携带这种酶,且乌头酸酶 1 号位点与性别决定基因连锁,便指出这些蛙类的性染色体可能表现为 1 对常染色体,且雄性性别决定基因位于其中 1 条同源染色体上。因传统的同工酶法筛选效率低、准确率不高,基于蛋白质组学和代谢组学可用于性别决定系统和性染色体的研究。

蛋白质组学提供了对特定细胞、组织或整个个体中所有受调控蛋白质的完整分析 (Zhu *et al.*, 2018),其可以通过研究蛋白质之间的相互作用以及蛋白质的表达修饰方式,来揭示蛋白质在生命过程中的作用 (Wilkins *et al.*, 1996)。代谢组学也是一门新的技术,研究目标是代谢小分子产物,如糖、有机酸和氨基酸等 (Oliver, 2002)。该技术有 2 个显著优势:一是在蛋白质水平或基因水平这类

微小的变化可在代谢水平放大,进而更容易被观测到(Miracle & Ankley, 2005; CuberoLeon *et al.*, 2012);二是代谢产物的种类比基因或蛋白质的种类少,因此操作简便,无需再进行全基因组测序或建立表达序列的大型数据库的步骤(Wang L *et al.*, 2019)。目前利用“组学”的方法进行科学研究越来越成熟,可以尝试运用这类“组学”方法对性染色体分化程度较低物种的性别决定机制进行研究,Wang T等(2019)采用了蛋白质组和代谢组相结合的方法,发现在河川沙塘鳢 *Odontobutis potamophila* 性别决定中起重要作用的蛋白质有 4 种,分别是 *Cttnb1*、*Piwil1*、*Hsd17b1* 和 *Dnali1*,而在性别决定中起重要作用的代谢过程是脂代谢。在上述实验中,通过使用定量 PCR 技术以及原位杂交技术,发现了目标蛋白质在雌雄个体中的表达不同,为进一步明确河川沙塘鳢的性别决定机制奠定了基础。

3 展望

由于年青性染色体系统的类群演化模式多种多样,甚至于同一物种或近缘种的性别决定机制或性染色体都会有所不同,并且与性别相关联的区域相对于基因组来说太小,因此需结合多种鉴定技术,从而准确鉴定性别决定系统和性染色体。在未来的研究中,可以将测序技术、组学数据和生物信息学结合起来,对非模式物种的性别决定系统及基因组进行深入研究,而这种综合研究可以算作性别组学的研究起点。对于新出现的概念——性别组学,几乎涵盖了基因组、转录组以及蛋白质组的全部信息(Stöck *et al.*, 2021)。这种综合性的组学方法将开启有关性染色体研究的新时代,它可以深入阐明脊椎动物的性别决定及性染色体进化问题,揭示其背后的遗传机理,也可解释更多年青性别决定系统的问题。到目前为止,在变温脊椎动物中,有关性别决定系统与生殖模式共同进化的信息还知之甚少(Charnov & Bull, 1977; Warner & Shine, 2008; Organ *et al.*, 2009)。

在此研究背景之下,未来的测序方向应集中在缺乏性别决定信息和生殖模式信息的物种上(Stöck *et al.*, 2021)。利用性别组学的方法,将会对非模式脊椎动物的性染色体序列信息有更深入的理解,也将会最终阐明性别决定为何有如此多的方式以及性别决定系统进化的动力和分子途径。

致谢:感谢中国科学院成都生物研究所两栖爬行类动物研究室的曾晓茂研究员和郑渝池副研究员在文章题材选取和内容讨论以及文稿撰写过程中给予了宝贵意见。

参考文献:

- 常晓媛,夏云,曾晓茂. 2013. ND-FISH 技术在两栖类中的应用[J]. 动物学研究, 34(6): 610-616.
- 陈慧玲. 2016. 中国家养双峰驼 Y 染色体 SNP、STR、CNV 与父系起源研究[D]. 陕西: 西北农林科技大学.
- 陈文伟,曹建萌,刘志刚,等. 2020. 罗非鱼性别相关微卫星标记的初步筛选[J]. 淡水渔业, 50(1): 22-30.
- 李树深,胡健生. 1996. 中国几种棘蛙的核型 C-带和 Ag-NORs 研究[J]. 动物学研究, 17(1): 84-88.
- 李树深,胡健生. 1999. 中国棘蛙属染色体演化和核型的地理分化[C]. 中国动物科学研究——中国动物学会第十四届会员代表大会及中国动物学会 65 周年年会论文集: 992-998.
- 林晓煜,肖世俊,李完波,等. 2018. 大黄鱼性别特异 SNP 标记的开发与验证[J]. 水产学报, 42(9): 1329-1337.
- 刘雪清,李莎,肖衍,等. 2015. 中华鲟性别相关的扩增片段长度多态性分子标记筛选[J]. 四川动物, 34(5): 714-718.
- 王子淑,王喜忠,陈文元. 1983. 蛙属(*Rana*)三种蛙染色体 C-带及 Ag-NORs 的比较研究[J]. 两栖爬行动物学报, 2(4): 1-6.
- 闫松松,苗亮,李多云,等. 2014. 香鱼(*Plecoglossus altivelis*)养殖群体遗传多样性的 AFLP 分析及性别特异性分子标记筛选[J]. 海洋与湖沼, 45(2): 395-399.
- 姚汶励,姜鹏,白俊杰,等. 2019. 基于高通量转录组测序的草鱼雌雄性腺差异表达基因分析[J]. 基因组学与应用生物学, 38(9): 3901-3911.
- 张加一,谷晓明. 1997. 水城棘腹蛙的核型和 Ag-NOR_s 研

- 究[J]. 贵州师范大学学报(自然科学版), 15(2): 50-53.
- Abbott JK, Nordén AK, Hansson B. 2017. Sex chromosome evolution: historical insights and future perspectives[J/OL]. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 284 (1854) : 20162806 [2021-06-01]. <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.2806>.
- Aitken RJ, Marshall GJA. 2002. The future of sex[J]. Nature, 415(6875): 963.
- Bachtrog D, Kirkpatrick M, Mank JE, *et al.* 2011. Are all sex chromosomes created equal [J]. Trends in Genetics, 27(9): 350-357.
- Bachtrog D, Mank JE, Peichel CL, *et al.* 2014. Sex determination: why so many ways of doing it [J/OL]. PLoS Biology, 12 (7) : e1001899 [2021-06-01]. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001899>.
- Bachtrog D. 2006. A dynamic view of sex chromosome evolution [J]. Current Opinion in Genetics & Development, 16(6): 578-585.
- Bachtrog D. 2013. Y-chromosome evolution: emerging insights into processes of Y-chromosome degeneration [J]. Nature Reviews Genetics, 14(2): 113-124.
- Bellott DW, Hughes JF, Skaletsky H, *et al.* 2014. Mammalian Y chromosomes retain widely expressed dosage-sensitive regulators[J]. Nature, 508(7497): 494-499.
- Beukeboom L, Perrin N. 2014. The evolution of sex determination [M]. New York: Oxford University Press: 1-17, 89-113.
- Campos-Ramos R, Harvey SC, Penman DJ. 2009. Sex-specific differences in the synaptonemal complex in the genus *Oreochromis* (Cichlidae) [J]. Genetica, 135 (3) : 325-332.
- Charlesworth D, Bergero R, Graham C, *et al.* 2021. How did the guppy Y chromosome evolve [J/OL]? PLoS Genetics, 17(8): e1009704 [2021-06-01]. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009704>.
- Charlesworth D, Charlesworth B, Marais G. 2005. Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes[J]. Heredity, 95(2): 118-128.
- Charnov EL, Bull J. 1977. When is sex environmentally determined[J]. Nature, 266(5605): 828-830.
- CuberoLeon E, Minier C, Rotchell JM, *et al.* 2012. Metabolic analysis of sex specific metabolites in gonads of the mussel, *Mytilus edulis*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics, 7(2): 212-219.
- Devlin RH, Nagahama Y. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences [J]. Aquaculture, 208(3-4): 191-364.
- Dixon G, Kitano J, Kirkpatrick M. 2019. The origin of a new sex chromosome by introgression between two stickleback fishes[J]. Molecular Biology and Evolution, 36(1): 28-38.
- Duminda SBD, Clare EH, Laura KH, *et al.* 2020. Identification of Y chromosome markers in the eastern three-lined skink (*Bassiana duperreyi*) using in silico whole genome subtraction[J]. BMC Genomics, 21(1): 593-940.
- Eggert C. 2004. Sex determination: the amphibian models [J]. Reproduction, Nutrition, Development, 44 (6) : 539-549.
- Feron R, Pan Q, Wen M, *et al.* 2021. RADSex: a computational workflow to study sex determination using restriction site-associated DNA sequencing data [J]. Molecular Ecology Resources, 21(5): 1715-1731.
- Feron R, Zahm M, Cabau C, *et al.* 2020. Characterization of a Y-specific duplication/insertion of the anti-Mullerian hormone type II receptor gene based on a chromosome-scale genome assembly of yellow perch, *Perca flavescens* [J]. Molecular Ecology Resources, 20(2): 531-543.
- Gamble T, Coryell J, Ezaz T, *et al.* 2015. Restriction site-associated DNA sequencing (RAD-seq) reveals an extraordinary number of transitions among gecko sex-determining systems [J]. Molecular Biology and Evolution, 32 (5) : 1296-1309.
- Gao D, Zheng M, Lin G, *et al.* 2020. Construction of high-density genetic map and mapping of sex-related loci in the yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) [J]. Marine Biotechnology, 22(1): 31-40.
- Gonen S, Lowe NR, Cezard T, *et al.* 2014. Linkage maps of the Atlantic salmon (*Salmo salar*) genome derived from RAD sequencing[J/OL]. BMC Genomics, 15(1): 166 [2021-06-01]. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-166>.

- Graves JAM. 2006. Sex chromosome specialization and degeneration in mammals[J]. *Cell*, 124(5): 901-914.
- Hillis DM, Green DM. 1990. Evolutionary changes of heterogametic sex in the phylogenetic history of amphibians [J]. *Journal of Evolutionary Biology*, 3(1-2): 49-64.
- Hu QM, Chang CF, Wang QH, *et al.* 2019. Genome-wide RAD sequencing to identify a sex-specific marker in Chinese giant salamander *Andrias davidianus*[J/OL]. *BMC Genomics*, 20(1): 415[2021-06-01]. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5771-5>.
- Jeffries DL, Lavanchy G, Sermier R, *et al.* 2018. A rapid rate of sex-chromosome turnover and non-random transitions in true frogs[J]. *Nature Communications*, 9(1): 1-11.
- Käfer J, Lartillot N, Marais GAB, *et al.* 2021. Detecting sex-linked genes using genotyped individuals sampled in natural populations[J/OL]. *Genetics*, 218(2): iyab053[2021-06-01]. <https://doi.org/10.1093/genetics/iyab053>.
- Kondo M, Nagao E, Mitani H, *et al.* 2001. Differences in recombination frequencies during female and male meioses of the sex chromosomes of the medaka, *Oryzias latipes*[J]. *Genetics Research*, 78(1): 23-30.
- Lambert MR, Skelly DK, Ezaz T. 2016. Sex-linked markers in the north American green frog (*Rana clamitans*) developed using DART-seq provide early insight into sex chromosome evolution[J/OL]. *BMC Genomics*, 17(1): 844[2021-06-01]. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3209-x>.
- Lin HL, Zhou ZX, Zhao J, *et al.* 2020. Genome-wide association study identifies genomic loci of sex determination and gonadosomatic index traits in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) [J]. *Marine Biotechnology*, 23(1): 127-139.
- Lynn A, Schrupp S, Cherry J, *et al.* 2005. Sex, not genotype, determines recombination levels in mice [J]. *The American Journal of Human Genetics*, 77(4): 670-675.
- Marshall GJA. 2008. Weird animal genomes and the evolution of vertebrate sex and sex chromosomes[J]. *Annual Review of Genetics*, 42: 565-586.
- Matsuba C, Alho JS, Merilä J. 2010. Recombination rate between sex chromosomes depends on phenotypic sex in the common frog[J]. *Evolution*, 64(12): 3634-3637.
- Miracle AL, Ankley GT. 2005. Ecotoxicogenomics: linkages between exposure and effects in assessing risks of aquatic contaminants to fish[J]. *Reproductive Toxicology*, 19(3): 321-326.
- Miura I, Ohtani H, Ogata M, *et al.* 2016. Evolutionary changes in sensitivity to hormonally induced gonadal sex reversal in a frog species[J]. *Sexual Development*, 10(2): 79-90.
- Miura I. 2017. Sex determination and sex chromosomes in Amphibia[J]. *Sexual Development*, 11(5-6): 298-306.
- Myosho T, Takehana Y, Hamaguchi S, *et al.* 2015. Turnover of sex chromosomes in celebensis group medaka fishes[J]. *G3*, 5(12): 2685-2691.
- Ogata M, Ohtani H, Igarashi T, *et al.* 2003. Change of the heterogametic sex from male to female in the frog [J]. *Genetics*, 164(2): 613-620.
- Oliver F. 2002. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes [J]. *Plant Molecular Biology*, 48(1-2): 155-171.
- Organ CL, Janes DE, Meade A, *et al.* 2009. Genotypic sex determination enabled adaptive radiations of extinct marine reptiles[J]. *Nature*, 461(7262): 389-392.
- Palaiokostas C, Bekaert M, Davie A, *et al.* 2013. Mapping the sex determination locus in the Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) using RAD sequencing[J]. *BMC Genomics*, 14: 566-577.
- Palmer DH, Rogers TF, Dean R, *et al.* 2019. How to identify sex chromosomes and their turnover [J]. *Molecular Ecology*, 28(21): 4709-4724.
- Perrin N. 2009. Sex reversal: a fountain of youth for sex chromosomes [J]. *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, 63(12): 3043-3049.
- Qin ZQ, Yang F, Tian L, *et al.* 2020. Induction of sex reversal in blue drum (*Nibea mitsukurii*) and gynogenetic yellow drum (*Nibea albiflora*) by oral administration of letrozole [J]. *Aquaculture Research*, 51(3): 882-889.
- Qiu CL, Han ZF, Li WB, *et al.* 2018. A high-density genetic linkage map and QTL mapping for growth and sex of yellow drum (*Nibea albiflora*) [J/OL]. *Scientific Reports*, 8(1): 17271[2021-06-01]. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-470>

- 35583-1.
- Rice WR. 1987. The accumulation of sexually antagonistic genes as a selective agent promoting the evolution of reduced recombination between primitive sex chromosomes [J]. *Evolution*, 41(4): 911-914.
- Richard PE. 1983. Inheritance and expression of a sex-linked enzyme in the frog, *Rana clamitans* [J]. *Biochemical Genetics*, 21(5-6): 435-442.
- Roco AS, Olmstead AW, Degitz SJ, *et al.* 2015. Coexistence of Y, W, and Z sex chromosomes in *Xenopus tropicalis* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(34): 4752-4761.
- Schartl M. 2015. Sex determination by multiple sex chromosomes in *Xenopus tropicalis* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(34): 10575-10576.
- Schlötterer C, Tobler R, Kofler R, *et al.* 2014. Sequencing pools of individuals mining genome-wide polymorphism data without big funding [J]. *Nature Reviews Genetics*, 15(11): 749-763.
- Schmid M, Steinlein C. 2001. Sex chromosomes, sex-linked genes, and sex determination in the vertebrate class Amphibia [M]// Scherer G, Schmid M. *Genes and mechanisms in vertebrate sex determination*. Switzerland: Birkhäuser Basel: 143-176.
- Shen FF, Long Y, Li FY, *et al.* 2020. *De novo* transcriptome assembly and sex-biased gene expression in the gonads of Amur catfish (*Silurus asotus*) [J]. *Genomics*, 112(3): 2603-2614.
- Steinemann S, Steinemann M. 2005. Y chromosomes: born to be destroyed [J]. *BioEssays*, 27(10): 1076-1083.
- Stöck M, Croll D, Dumas Z, *et al.* 2011. A cryptic heterogametic transition revealed by sex-linked DNA markers in Palearctic green toads [J]. *Journal of Evolutionary Biology*, 24(5): 1064-1070.
- Stöck M, Kratochvíl L, Kuhl H, *et al.* 2021. A brief review of vertebrate sex evolution with a pledge for integrative research: towards 'sexomics' [J/OL]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 376(1832): 2200426 [2021-06-01]. <https://doi.org/10.1098/rstb.2020.0426>.
- Stöck M, Savary R, Betto-Colliard C, *et al.* 2013. Low rates of X-Y recombination, not turnovers, account for homomorphic sex chromosomes in several diploid species of Palearctic green toads (*Bufo viridis* subgroup) [J]. *Journal of Evolutionary Biology*, 26(3): 674-682.
- Sun S, Li WB, Xiao SJ, *et al.* 2018. Genetic sex identification and the potential sex determination system in the yellow drum (*Nibea albiflora*) [J]. *Aquaculture*, 492: 253-258.
- Tanaka K, Takehana Y, Naruse K, *et al.* 2007. Evidence for different origins of sex chromosomes in closely related *Oryzias* fishes: substitution of the master sex-determining gene [J]. *Genetics*, 177(4): 2075-2081.
- Toups MA, Rodrigues N, Perrin N, *et al.* 2019. A reciprocal translocation radically reshapes sex-linked inheritance in the common frog [J]. *Molecular Ecology*, 28(8): 1877-1889.
- Uchino T, Hosoda E, Nakamura Y, *et al.* 2018. Genotyping-by-sequencing for construction of a new genetic linkage map and QTL analysis of growth-related traits in Pacific bluefin tuna [J]. *Aquaculture Research*, 49(3): 1293-1301.
- Vicoso B, Bachtrog D. 2011. Lack of global dosage compensation in *Schistosoma mansoni*, a female-heterogametic parasite [J]. *Genome Biology and Evolution*, (3): 230-235.
- Vicoso B, Bachtrog D. 2013. Reversal of an ancient sex chromosome to an autosome in *Drosophila* [J]. *Nature*, 499(7458): 332-335.
- Vicoso B. 2019. Molecular and evolutionary dynamics of animal sex-chromosome turnover [J]. *Nature Ecology & Evolution*, 3(12): 1632-1641.
- Volff JN, Nanda I, Schmid M, *et al.* 2007. Governing sex determination in fish: regulatory putsches and ephemeral dictators [J]. *Sexual Development*, 1(2): 85-99.
- Wang L, Xie N, Shen Y, *et al.* 2019. Constructing high-density genetic maps and developing sexing markers in northern snakehead (*Channa argus*) [J]. *Marine Biotechnology*, 21(3): 348-358.
- Wang T, Zhu WX, Zhang HY, *et al.* 2019. Integrated analysis of proteomics and metabolomics reveals the potential sex determination mechanism in *Odontobutis potamophila* [J/OL]. *Journal of Proteomics*, 208(C): 103482 [2021-06-01].

- 01]. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103482>.
- Warner D, Shine R. 2008 The adaptive significance of temperature-dependent sex determination in a reptile [J]. *Nature*, 451(7178): 566-568.
- Wen M, Feron R, Pan QW, *et al.* 2019. Sex chromosome and sex locus characterization in the goldfish, *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758)[J]. *BMC Genomics*, 21(1): 552.
- Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, *et al.* 1996. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electro-phoresis and amino acid analysis [J]. *Biotechnology*, 14: 61-65.
- Yuan SQ, Xia Y, Zeng XM. 2017. A sex-linked microsatellite marker reveals male heterogamety in *Quasipaa boulengeri* (Anura: Dicroglossidae) [J]. *Asian Herpetological Research*, 8(3): 184-189.
- Zhang AD, Huang R, Chen LM, *et al.* 2017. Computational identification of Y-linked markers and genes in the grass carp genome by using a pool-and-sequence method [J/OL]. *Scientific Reports*, 7(1): 8213 [2021-06-01]. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08476-y>.
- Zhou Q, Zhang J, Bachtrog D, *et al.* 2014. Complex evolutionary trajectories of sex chromosomes across bird taxa [J/OL]. *Science*, 346 (6215) : 1246338 [2021-06-01]. <https://doi.org/10.1126/science.1246338>.
- Zhu LM, Gao N, Wang RF, *et al.* 2018. Proteomic and metabolomic analysis of marine medaka (*Oryzias melastigma*) after acute ammonia exposure[J]. *Ecotoxicology*, 27(3): 267-277.

传播科学信息的媒介 开展学术交流的平台

欢迎订阅 2023 年第 42 卷四川动物杂志

四川动物杂志系四川省动物学会、成都大熊猫繁育研究基金会、四川省野生动植物保护协会和四川大学联合主办,创刊于1981年,系国内外公开发行的动物学学术性刊物,主要报道和交流动物学及其分支学科和野生动物保护方面的基础研究、应用基础研究的成果、理论、经验和动态;普及与提高相结合,基础性与应用性并重。先后为《中文核心期刊要目总览(2004年版、2008年版、2011年版、2014年版、2017年版、2020年版)》核心期刊、中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊),被中国科学引文数据库、中国学术期刊综合评价数据库、中国生物学文摘数据库、中国生物医学文献数据库、中文科技期刊数据库(维普资讯网)、中国学术期刊(光盘版)、中国期刊网(中国知网)、万方数据系统(中国数字化期刊群)、台湾中文电子期刊思博网及英国 Zoological Record 文摘数据库收录。

●主要栏目:研究报告、基础资料、野生动物保护与自然保护区、教学探索、综述。

●读者对象:广大从事动物学、生物学和野生动物保护方面的科研、教学、管理、医卫等科技工作者,有关院校师生和业余爱好者。

●双月刊,大16开,每期124页,精印彩色封面,逢单月末出版,2023年全年6期国内定价300元(每期50元),国外为每期20美元,全年120美元。

●订阅办法:汇款至本刊,写清订阅人姓名、地址、电话,附言订阅数量即可。

电话/微信:028-85410485/15881112385

电子邮箱:scdwz001@163.com scdwzz@vip.163.com

银行汇款:开户银行:中国工商银行四川分行营业部东大支行(工行成都东大支行营业室)

户名:四川省动物学会

帐号:4402298009000012596