

## 歐利亞吳郭魚性別決定之研究

張格銓<sup>1\*</sup> · 張湧泉<sup>1</sup> · 陳榮華<sup>1</sup> · 劉富光<sup>2</sup>

<sup>1</sup>行政院農業委員會水產試驗所淡水繁養殖研究中心

<sup>2</sup>行政院農業委員會水產試驗所

### 摘 要

本研究應用吳郭魚遺傳連鎖圖譜 (linkage map)，以微衛星 (microsatellite) 分析二對歐利亞吳郭魚及其子代之性別決定相關之連鎖族群 (linkage group, LG)，試驗一共篩選出 6 個微衛星基因座 (GM201、UNH104、GM271、GM354、UNH131 及 UNH168，分別位於 LG1 和 LG3) 進行基因型分析。結果顯示，二對歐利亞吳郭魚 (A1 與 A2 家系) 的性別決定與 GM271、GM354、UNH131 及 UNH168 等四個基因座標志有相關性 ( $p < 0.001$ )，推測歐利亞吳郭魚的性別決定應受到 LG3 所影響。進一步分析 LG3 與性別決定之關聯性，可確定 A1 與 A2 家系的性別決定系統為 WZ-ZZ 系統，此外，部分子代也發現有染色體交換的現象。根據這些結果將 A2 家系進行數量性狀基因座定位 (quantitative traits loci mapping)，可瞭解基因座相對位置與遺傳重組之頻度。總之，本研究方法未來可應用於其他種類吳郭魚之性別決定研究並有助於遺傳育種等改良工作。

關鍵詞：歐利亞吳郭魚、微衛星、連鎖族群、數量性狀基因座定位、性別決定

### 前 言

根據 FAO (2012) 的統計資料顯示，全世界全年約生產約 450 萬噸的吳郭魚，佔全球水產品總供應量的 5% 以上，主要的生產國為中國 (約 155 萬噸)、埃及 (約 76 萬噸)、印尼 (約 72 萬噸)、巴西 (約 28 萬噸)、菲律賓 (約 26 萬噸)、泰國 (約 15 萬噸)、孟加拉 (約 12 萬噸)、越南 (約 10 萬噸) 及臺灣 (約 7.3 萬噸)，由此可見，吳郭魚是全球性重要的養殖魚種。

水產試驗所淡水繁養殖研究中心近年來積極進行吳郭魚的遺傳育種工作，最近不僅選育了新品系尼羅吳郭魚 (*Oreochromis niloticus*) (N<sub>2</sub>) 且研發快速成長品系 (N<sub>2</sub>A)。N<sub>2</sub>A 結合了成長佳和高比例雄性率等特色，是適合推廣的品系 (陳等, 2008)。然而，吳郭魚的成長與性別系統相當複雜，以傳統方式進行選育種，需花費很多時間進行子

代試驗，若加入分子標志輔助遺傳研究，應可縮短選育之時間。

隨著生物科技的快速發展，吳郭魚的遺傳研究也開始應用 DNA 標志，小衛星 (minisatellite) 與 RAPD (random amplified polymorphic DNA) 等方法是最早被應用的技術 (Carter *et al.*, 1991; Bardacki and Skibinski, 1994)。微衛星方法起初由 Lee and Kocher (1996) 開發 140 個微衛星分子標志，Carleton *et al.* (2002) 陸續發展出 165 個微衛星分子標志，挪威的一家私人企業 (Genomar) 再研發 1,319 個尼羅吳郭魚微衛星分子標志 (Lee *et al.*, 2005)。在遺傳標志連鎖圖譜方面，第一代的連鎖圖譜是由 AFLP (amplified fragment length polymorphism) 標志與微衛星標志所繪製而成 (Kocher *et al.*, 1998)，遺傳標志約有 200 多個。第二代連鎖圖譜是現今研究吳郭魚遺傳育種的主要參考圖 (Lee *et al.*, 2005)，其內容包括 525 個微衛星標志和 21 個功能性基因之遺傳標志，主要分為 24 個連鎖群 (22 個大連鎖與 2 個小連鎖)，該圖譜至今仍不斷強化功能性基因等資訊，可運用在性別分化、耐鹽能力、抗寒性、免疫與基因調控等

\*通訊作者/彰化縣鹿港鎮海埔里 106 號, TEL: (04) 777-2175; FAX: (04) 777-5424; E-mail: glenn@mail.fwtk.tfrin.gov.tw

之研究參考。

由於雄性吳郭魚的體型是雌性的二倍，所以性別決定與成長息息相關，最新的研究顯示，染色體在性別決定與分化上之影響最大，但一些未知的遺傳因子與環境也會影響性別的分化 (Baroiller *et al.*, 2009)，故在吳郭魚的性別決定上，雖然染色體的遺傳是主要的性別分化因子，但也會受到其他因素影響。國外的報告也指出不同種系吳郭魚之性別決定會受到多個遺傳連鎖群影響，其中 Cnaani *et al.* (2008) 指出吳郭魚的性別遺傳主要取決於吳郭魚連鎖圖譜 (Lee *et al.*, 2005) 的 Linkage group 1 和 3 (LG1, LG3)，爾後 Eshel *et al.* (2010) 也發現 LG23 對尼羅吳郭魚的雄性決定有顯著的影響力。

臺灣的吳郭魚最早自 1946 年從南洋引進，至今分別引進莫三比克 (*O. mossambicus*)、尼羅、吉利 (*Tilapia zillii*)、歐利亞 (*O. aurea*)、賀諾奴 (*O. urolepis hornorum*)、斯皮路勒 (*O. spilurus*) 等魚種，FAO (2012) 的資料顯示，雜交品系是臺灣目前的主要養殖種類。淡水繁養殖研究中心長期保有上述各種吳郭魚，近年也應用生物技術輔助鑑別品種與混雜種的判定 (張等, 2009, 2010)。其中，保種的歐利亞吳郭魚已歷經近 40 年的選育工作，品系純度高，相當適合做為研究性別之試驗魚種，若確認歐利亞吳郭魚的性別系統與遺傳模式，則能嘗試以分子標誌進行輔助育種，對未來吳郭魚之改良研究將有很大的助益。由於群體選育需顧慮的因素較多，進行家系 (一雌對一雄的交配) 培育應是合適的研究模式，因此本研究進行歐利亞吳郭魚一對一配對，再將魚苗培育至適當體型以便由生殖孔判斷性別，另以第二代連鎖圖譜為參考，進行微衛星標誌分析歐利亞吳郭魚性別決定相關區域 (LG1, LG3 與 LG23)，以瞭解其性別系統。

## 材料與方法

### 一、試驗魚種

歐利亞吳郭魚於民國 63 年自以色列引進，多年來皆妥善保存在淡水繁養殖研究中心，本研究係自保種池隨機挑選成熟的歐利亞吳郭魚，以一對一的配對方式使其分別自交繁殖，繁殖期間水

溫為 26 ~ 30 °C，本試驗計有二對歐利亞吳郭魚產出子代，分別標記為 A1 家系與 A2 家系。對於產出子代的親魚，立即採樣少許之臀鰭組織，子代則以商業性飼料飼養至性成熟，以人工方式由生殖孔判斷性別後，同樣採取少許的臀鰭組織，以利後續試驗進行。

## 二、試驗方法

### (一) DNA 全液萃取

將臀鰭組織以 MasterPure DNA Purification Kit (Epicentre, USA) 萃取 DNA 後，以 NanoDrop 2000 核酸分析儀 (Thermo, USA) 測定濃度後保存於 -20 °C 冰箱備用。

### (二) 微衛星 DNA 之增幅

主要選取 6 個微衛星基因座 (Table 1) (Cnaani *et al.*, 2008) 作為分子標記，將各個引子對 (primer pairs) 分別與親魚樣本之 genomic DNA 進行 PCR 反應，forward primers 用 FAM 或 HEX 螢光作標記 (Table 1)。PCR 反應試液包含：genomic DNA (25 ng/μl) 1 μl，10 μM forward-primer 1 μl，10 μM reverse-primer 1 μl，Thermo Hot Starr PCR Mastermix (2X) 12.5 μl 及無菌水 9.5 μl，總體積 25 μl，置於 MyCycler thermal cycler (BIO-RAD, USA) 進行增幅；增幅條件為：denature (94 °C, 30 sec)，annealing (不同引子對之適當溫度, 30 sec)，extension (72 °C, 30 sec)，經過 30 次循環後，降至 4 °C 終止反應。反應結束後，取 10 μl 進行 DNA 洋菜電泳，以檢驗 DNA 產物是否存在。

### (三) 基因型分析 (Genotyping)

將在電泳膠片上有反應之微衛星 DNA 產物，委託昕穎生物科技股份有限公司實施基因型分析。使用 GeneMapper 4.0 分析各基因座之等位基因型，以人工校對方法，匯整各基因座之多型性資訊。

## 三、統計分析

初步評估各子代遺傳型是否符合分配率，再檢查是否與性別遺傳相關，而後將等位基因型與

**Table 1** Characteristics of the six microsatellite DNA loci

Markers	Primer sequence (5'-3')	Anneal (°C)	Fluorescent dyes labeling on the forward primer	Linkage group
GM201	F: TATTCAGGCTCTTCTTTTGCT R: CAGAATGAACTCCCTCCAG	52	HEX	1
UNH104	F: GCAGTTATTTGTGGTCACTA R: GGTATATGTCTAACTGAAATCC	50	FAM	1
GM271	F: GCAGCTGGATCAGTCTCTG R: TGGGAAGTCGTCATACAAAG	53	HEX	3
GM354	F: CGGGAGAGCAGGTCAG R: CACGTTCAAGGTTACTGTGTT	52	HEX	3
UNH131	F: CAGAATCAACTTTTGGA R: GTGATTTTAAATAGACCTTCACTA	51	FAM	3
UNH168	F: TAAGAAGGTTAGAAAAGAAAGTG R: TATATAATAATTCCTAAACGGC	47	FAM	3

**Table 2** Allele distribution of the A1 family pedigree at the six selected loci

Locus	Maternal haplotype	Paternal haplotype	Haplotypes in offspring	Number of female offspring	Number of male offspring	Chi square test
GM201	134/144	144/144	134/144 144/144	14 28	7 9	$p > 0.05$
UNH104	190/190	190/200	190/190 190/200	15 27	9 7	$p > 0.05$
GM271	113/121	113/113	113/113 113/121	1 41	15 1	$p < 0.001$
GM354	103/111	111/111	103/111 111/111	41 1	1 15	$p < 0.001$
UNH131	185/191	191/191	185/191 191/191	42 0	0 16	$p < 0.001$
UNH168	132/168	132/132	132/132 132/168	1 41	16 0	$p < 0.001$

性別之相關性進行卡方分析 (Pearson Chi square test)，並以  $p$  值 0.05、0.01 與 0.001 分別表示顯著程度，用以區別不同基因座與性別相關性之差異。

## 結 果

試驗計有二對歐利亞吳郭魚產出子代，A1 家系之親代生下 58 尾子代，A2 家系的親代則產出

222 尾。試驗共選擇 15 組微衛星引子進行親魚的初步分析，之後篩選 6 組微衛星引子進行子代試驗分析 (A1 家系 58 尾、A2 家系 95 尾)，再以卡方分析判斷各基因座與性別之相關性 (Tables 2, 3)。以 Table 2 的基因座 GM201 為例，雌性種魚的基因型為異型 (134/144)，雄性種魚為同型 (144/144)，牠們的子代共有兩型，分別為異型 (134/144) 與同型 (144/144)，其中異型 (134/144) 計有 21 尾子代 (14 尾雌性，7 尾雄性)；同型

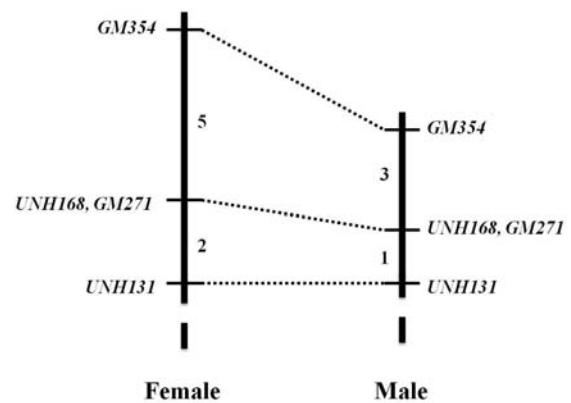
**Table 3** Allele distribution of the A2 family pedigree at the four selected loci

Locus	Maternal haplotype	Paternal haplotype	Haplotypes in offspring	Number of female offspring	Number of male offspring	Chi square test
GM271	113/121	97/113	97/113	0	28	p<0.001
			97/121	14	0	
			113/113	0	32	
			113/121	21	0	
GM354	103/111	111/113	103/111	20	1	p<0.001
			103/113	12	1	
			111/111	2	30	
			111/113	1	28	
UNH131	185/191	191/257	185/191	21	0	p<0.001
			185/257	13	0	
			191/191	1	32	
			191/257	0	28	
UNH168	132/168	132/134	132/132	0	32	p<0.001
			132/134	0	28	
			132/168	21	0	
			134/168	14	0	

(144/144) 則有 37 尾子代 (28 尾雌性, 9 尾雄性)。

統計的結果顯示, 二個家系之性別決定皆與 LG3 的 4 個基因座標誌 (GM271、GM354、UNH131 與 UNH168) 有顯著的相關性 ( $p<0.001$ ) (Tables 2, 3), 其中 A1 家系另檢測 LG1 上的 GM201 和 UNH104 基因座標誌, 但與子代之性別無相關性 (Table 2)。

本研究發現, A1 和 A2 家系均有染色體交換 (crossover) 的現象, 乃參考第二代連鎖圖譜 (Lee *et al.*, 2005), 將 A2 家族位於 LG3 的四個基因型進行連鎖分析, 發現 87 尾子代在此遺傳區域 (GM354-UNH131) 完全連鎖, 6 尾出現一次互換 (crossover event), 另外有二尾出現二次互換, 互換率 (recombination ratio) 為 0.084。根據上述的結果, 進一步進行數量性狀基因座定位 (quantitative traits loci mapping), 將 A2 子代的每一個體分別進行基因座排序, 確認實際發生遺傳重組的個體, 統計重組的數量、位置與頻率, 再以重組發生之比例推算 A2 之遺傳連鎖圖 (Fig. 1)。結果顯示 A2 家系無論在雌性或雄性的遺傳, 皆能計算出跨越的遺傳距離 (雌種 7 cM、雄種 4 cM)。



**Fig. 1** Sex-specific linkage maps in the A2 family. Four markers were polymorphic with both sexes. The inheritance pattern of haplotypes spanning 7 cM (in females) and 4 cM (in males) were examined.

## 討 論

在基因座選擇方面, 係參考 Cnaani *et al.* (2008) 與 Eshel *et al.* (2010) 的試驗, 在 LG1 選擇了 UNH995、GM201、UNH148、UNH995、UNH104 與 UNH868 等六個基因座標誌, LG3 則選 GM354、

UNH168、GM204、GM271、GM180、UNH131 及 CLCN5 等七個基因座標誌，另外於 LG23 選了 UNH898 和 UNH216 等二個基因座標誌，再將 A1 與 A2 家系之親魚進行初步之基因型分析。結果顯示有許多的基因座不適合進行進一步的分析，例如 UNH868、GM180、CLCN5、UNH898 與 UNH216 在親魚的遺傳型皆為同型合子，其他如 UNH995 和 GM204 同型合子較多，也不適合進行子代基因型分析。最後，試驗共篩選六個較具多型性的基因座標誌 (GM201、UNH104、GM271、GM354、UNH131 及 UNH168) 進行子代基因型分析。一般來說，分析具多型性的基因座有助於進行數量性狀基因座之定位 (Danzmann and Ghabi, 2001)。

Table 2 之結果顯示，A1 家族子代之性別在 GM201 與 UNH104 之等位基因並無相關性 ( $p > 0.05$ )，Cnaani *et al.* (2008) 發現埃及品系的歐利亞吳郭魚性別主要受到 LG1 之影響，少數以色列品系之歐利亞吳郭魚的性別也與 LG1 有關。雖然本中心之歐利亞吳郭魚源自以色列，但過去從未檢驗其品系，本試驗考量 LG1 同型合子比率偏高與實驗設計策略，僅代表性的選擇 GM201 與 UNH104 兩個基因座標誌進行 A1 家系之基因型分析，試驗後可推測 A1 家系的子代性別應與 LG1 無關，A2 家系子代則未分析 LG1 的基因型，尚不清楚其性別決定是否與 LG1 有相關性。

由於 Tables 2、3 中，四個位於 LG3 上的基因座標誌 (GM271、GM354、UNH131 及 UNH168) 與 A1 及 A2 子代的性別具有高度的相關性 ( $p < 0.001$ )，顯示這些基因座可用來輔助鑑定二個家系之性別，其中 Table 2 的 UNH131 和 Table 3 的 GM271、UNH168 等之  $p$  值極為顯著，表示兩個歐利亞吳郭魚的家系之性別決定與 LG3 的關係密切。Cnaani *et al.* (2008) 研究顯示，部分埃及品系的性別決定與 LG3 相關 ( $p < 0.05$ )，以色列品系皆與 LG3 高度相關 ( $p < 0.001$ )，其中少數家系同時與 LG1 相關 ( $p < 0.01$ )。因此，綜合 LG1 與 LG3 的基因型分析結果，本中心所保存的歐利亞吳郭魚之性別決定機制較類似於上述之以色列品系。

魚類在進行有性生殖時，生殖細胞的兩條染色體在減數分裂第一前期進行配對時，部分的 DNA 可能會發生交換，因而造成遺傳序列的重組 (recombination)，導致後代的遺傳發生變異，這

種現象稱之為染色體交換。再者，二個遺傳標誌之間交換的頻率越高，代表彼此之間的遺傳距離 (cM, centiMorgans) 越長，這些資訊可用來輔助數量性狀基因座定位 (Danzmann and Ghabi, 2001)。本試驗中，A1 與 A2 家系都發現染色體有交換現象，除了 A1 家系之雄性遺傳為同型無法計算，基本上雌、雄都有一定比例的重組產生；而 Cnaani *et al.* (2008) 指出歐利亞吳郭魚在雄性遺傳部分有一些重組的發生，但在雌性遺傳部分卻鮮少出現重組。

在吳郭魚的性染色體遺傳研究方面，目前已發現有雄性異型合子系統 (XX-XY system) 與雌性異型合子系統 (WZ-ZZ system) 兩種，國外的研究顯示 XX-XY 系統所包含的種類有尼羅吳郭魚、莫三比克吳郭魚與吉利吳郭魚等；WZ-ZZ 系統的魚種則有賀諾奴吳郭魚、歐利亞吳郭魚、*O. Karongae* 及 *T. mariae* 等 (Mair *et al.*, 1991a,b; Desprez *et al.*, 2003; Cnaani *et al.*, 2008)。從 Table 2 與 Table 3 的結果來看，兩家系之雌性種或其產出的雌性子代在 LG3 的四個基因座 (GM271、GM354、UNH131 與 UNH168) 幾乎都是異型，這些基因型結果顯示，本中心所保存之歐利亞吳郭魚的性別系統為 WZ-ZZ 系統，與 Cnaani *et al.* (2008) 分析歐利亞吳郭魚 (以色列品系) 的結果一致。由此可知，同時分析 LG3 的四個基因座的標誌，應可提早鑑定吳郭魚魚苗或受精卵之性別，無需等待其進行性別分化，理論上，A2 家系子代的性別鑑定準確度約 91.6% (互換率 0.084)，若剔除發生重組的個體，準確度為 100%。因此，提早鑑定吳郭魚之性別可用於輔助選種或計算魚苗之性別比例，除可加速研究之進行，又能減少培育魚隻時的花費。

不少研究也顯示，尼羅吳郭魚的魚苗早期受到高溫的影響 (約 36 °C)，可提高雄性比例 (Baroiller *et al.*, 1995; D'Cotta *et al.*, 2001; Tessema *et al.*, 2006; Bezault *et al.*, 2007)，Baroiller *et al.* (2009) 認為，除了尼羅吳郭魚會受到高溫影響而改變 LG1 的判讀結果，其他的遺傳連鎖群 (LG3 或 LG23) 也可能在類似的環境影響下改變吳郭魚性別之分化。本試驗在進行配對至魚苗 3 週齡期間，水溫約維持在 26 ~ 30 °C，理論上應不易發生環境因子操控性別的情況，更進一步的以數量性

狀分析來說，也沒有發現完全連鎖遺傳之子代性別發生改變。因此可以推斷，A1 與 A2 家系在本試驗中，子代的性別決定未受到環境溫度的影響。

本試驗係針對淡水繁養殖研究中心所保存的歐利亞吳郭魚，以第二代遺傳連鎖圖譜進行微衛星基因座與其基因型的分析，結果顯示歐利亞吳郭魚的性別決定與遺傳連鎖群 LG3 有高度的相關性 ( $p < 0.001$ )，換言之，二個家系的歐利亞吳郭魚之性別主要仰賴染色體來決定。另外，由於歐利亞吳郭魚的性別決定為 WZ-ZZ 系統，因此，在 LG3 上的四個微衛星基因座標誌 (GM201、UNH104、GM271、GM354) 應可發展成性別遺傳標誌，或可提早鑑定受精卵或魚苗的性別，或應用於標誌輔助育種 (marker-assisted selection)。本試驗方法亦可應用在尼羅吳郭魚、莫三比克吳郭魚等其他重要種系之性別決定研究，或應用於篩選成長、抗寒及耐鹽性等品系之研究。

## 謝 辭

本試驗得以順利完成，承以色列吳郭魚專家 Gideon Hulata 博士在試驗設計上給予建議；Avner Cnaani 博士指導數量性狀基因座定位之繪圖技巧，特此表示謝意。

## 參考文獻

- 陳榮華, 張湧泉, 張格銓, 劉富光 (2008) 吳郭魚雜交與自交系的成長比較—快速成長品系之研發. 水產研究, 16(2): 41-47.
- 張格銓, 張湧泉, 陳榮華, 張素容, 劉富光 (2009) 利用 PCR-RFLP 技術鑑別五種吳郭魚. 水產研究, 17(2): 77-85.
- 張格銓, 張湧泉, 陳榮華, 劉富光 (2010) 利用粒線體 DNA D-loop 之 PCR-RFLP 分析鑑別吳郭魚雜交子代之母系遺傳研究. 水產研究, 18(2): 89-94.
- Bardakci, F. and D. O. F. Skibinski (1994) Application of the RAPD technique in tilapia fish species and subspecies identification. *Heredity*, 73: 117-123.
- Baroiller, J. F., D. Chourrout, A. Fostier and B. Jalabert (1995) Temperature and sex chromosomes govern sex ratios of the mouthbrooding cichlid fish *Oreochromis niloticus*. *J. Exp. Zool.*, 273: 216-223.
- Baroiller, J. F., H. D'Cotta, E. Bezault, S. Wessels and G. Hoerstgen-Schwark (2009) Tilapia sex determination: Where temperature and genetics meet *Comp. Biochem. Physiol. A: Physiol.*, 153: 30-38.
- Bezault, E., F. Clota, M. Derivaz, B. Chevassus and J. F. Baroiller (2007) Sex determination and temperature-induced sex differentiation in three natural populations of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) adapted to extreme temperature conditions. *Aquaculture*, 272: S3-S16.
- Carleton, K. L., J. T. Streebman, B.-Y. Lee, N. Garnhart, M. Kidd and T. D. Kocher (2002) Rapid isolation of CA microsatellite from the tilapia genome. *Anim. Genet.*, 33: 140-144.
- Carter R. E., G. C. Mair, D. O. F. Skibinski, D. Y. Parkin and J. A. Beardmore (1991) The application of DNA fingerprinting in the analysis of gynogenesis in tilapia. *Aquaculture*, 95: 41-52.
- Cnaani, A., B.-Y. Lee, N. Zilberman, C. Ozouf-Costaz *et al.* (2008) Genetics of sex determination in Tilapiine species. *Sex. Dev.*, 2: 43-54.
- Danzmann, R. G. and K. Gharbi (2001) Gene mapping in fishes: a means to an end. *Genetica*, 111: 2-23.
- D'Cotta, H., Y. Guiguen, M. S. Govoroun, O. McMeel and J. F. Baroiller (2001) Aromatase plays a key role during normal and temperature-induced sex differentiation of tilapia *Oreochromis niloticus*. *Mol. Reprod. Dev.*, 59: 265-276.
- Desprez, D., C. Mélard, M. C. Hoareau, Y. Bellemène, P. Bosc and J. F. Baroiller (2003) Inheritance of sex in two ZZ pseudofemale lines of tilapia *Oreochromis aureus*. *Aquaculture*, 218: 131-140.
- Eshel, O., A. Shirak, J. I. Weller, T. Slossman, G. Hulata, A. Cnaani and M. Ron (2010) Fine-mapping of a locus on linkage group 23 for sex determination in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Animal Gen.*, 42: 222-224.
- FAO (2012) Fisheries and Aquaculture Statistics. FAO Yearbook, 243 pp.
- Kocher, T. D., W. J. Lee, H. Sobolewska, D. Penman and B. McAndrew (1998) A genetic linkage map of a cichlid fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Genetics*, 148: 1225-1232.
- Lee, B.-Y. and T. D. Kocher (1996) Microsatellite DNA markers for genetic mapping in the tilapia, *Oreochromis niloticus*. *J. Fish Biol.*, 49: 169-171.
- Lee, B.-Y., W. J. Streebman, K. L. Carleton, A. Howe, *et al.* (2005) A second-generation genetic linkage map of tilapia (*Oreochromis* spp.). *Genetics*, 170: 237-244.

Mair, G. C., A. G. Scott, D. Penman, J. A. Beardmore and D. O. Skibinski (1991a) Sex determination in genus *Oreochromis*: 1-sex reversal, gynogenesis and triploidy in *O. niloticus* (L.). *Thero. Appl. Genet.*, 82: 144-152.

Mair, G. C., A. G. Scott, D. Penman, D. O. F. Skibinski and J. A. Beardmore (1991b). II. Sex reversal,

hybridisation, gynogenesis and triploidy in *O. aureus* Steindachner. *Thero. Appl. Genet.*, 82: 153-160.

Tessema, M., A. Müller-Belecke and G. Hörstgen-Schwark (2006) Effect of rearing temperatures on the sex ratio of *Oreochromis niloticus* populations. *Aquaculture*, 258: 270-277.

## Sex Determination of the Blue Tilapia, *Oreochromis aureus*

Ke-Chuan Chang<sup>1\*</sup>, Yuon-Chuan Chang<sup>1</sup>, Rong-Hwa Chen<sup>1</sup> and Fu-Guang Liu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Freshwater Aquaculture Research Center, Fisheries Research Institute

<sup>2</sup>Fisheries Research Institute

### ABSTRACT

In this study, we applied the microsatellite DNA markers and genetic linkage method to analyze the relationship between linkage groups (LG) and sex determination in two blue tilapia (*Oreochromis aureus*) families. The microsatellite loci (GM201 and UNH104 on LG1; GM271, GM354, UNH131 and UNH168 on LG3) were used for genotyping. The results showed that GM271, GM354, UNH131 and UNH168 were associated with sexuality ( $p < 0.001$ ) in two blue tilapia families (the A1 and A2 families), indicating that the sex-determining locus might be located on LG3 in local blue tilapia. Furthermore, the microsatellite markers on LG3 were closely related with the WZ-ZZ system in the A1 and A2 families. In addition, chromosome crossovers were observed in a small number of offspring. The A2 family was then subjected to quantitative traits loci mapping. In conclusion, the methods we used could be useful for analyzing the sex-determining locus in other tilapia species, and for facilitating the genetic selection and breeding of these fish.

**Key words:** blue tilapia, *Oreochromis aureus*, microsatellite, linkage group, quantitative traits loci mapping, sex determination

---

\*Correspondence: Freshwater Aquaculture Research Center, Fisheries Research Institute, 106 Hai-Pu, Lukang 50562, Taiwan. TEL: (04) 777-2175; FAX: (04) 777-5424; E-mail: glenn@mail.fwlk.tfrin.gov.tw