

# 鸡性别决定机制及相关基因研究进展

孟和 潘玉春\*

(上海交通大学农业与生物学院 上海 201101)

摘要:鸡性别决定虽然同哺乳动物一样受遗传控制,但其性染色体组成为 ZZ/ZW,同哺乳动物相反呈现雌异型,并且鸡性腺性别分化同一些低等脊椎动物一样易受性激素影响。目前参照哺乳动物性别决定相关基因已获得了一些鸡同源基因序列(AMH, SF1, DAX1, SOX9)和3个可能与鸡性别决定有重要关联的候选基因(DMRT1, ASW 和 FET1)。对这些基因的表达模式及其在层次调控中的功能比较分析结果显示,鸡性别决定的遗传机制同其它脊椎动物相对一致,但也有明显的不同。

关键词:鸡,性别决定,候选基因,表达模式,动物模型

中图分类号:Q95 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2005)02-106-06

## Progress in the Research of Sex Determination Mechanism and Associated Genes in Chicken

MENG He PAN Yu-Chun

(College of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 201101, China)

**Abstract:** Birds exhibit genetic sex determination as mammals, but their sex is determined by ZZ:ZW sex chromosome system, characterized by female heterogamety, contrary to the male heterogamety in mammals, and their gonadal development is sensitive to the estrogen as some lower vertebrates. Several genes (AMH, SF1, DAX1 and SOX9 etc.) homogenous with genes critical for mammalian sex determination have been identified in the chicken, and comparative studies of their expression pattern and cascade regulation show that the chicken sex determination mechanism is generally consistent with other vertebrates, but still has distinctions. Subsequently, we present three candidate genes (DMRT1, ASW and FET1) which were detected lately and may be important for chicken sex determination. Chicken is an excellent animal model for research of sex determination and functional genome.

**Key words:** Chicken; Sex determination; Candidate gene; Expression pattern; Animal model

在性别决定和分化现象普遍存在的生物体中,其决定机制一直是生物学领域研究的热点问题。对脊椎动物而言,性别决定受遗传或环境因素所控制,其中哺乳动物和鸟类的性别决定受遗传因素所决定。同哺乳动物所具有的 XX:XY 雄异型性染色体系统不同,鸟类具有 ZZ:ZW 性染色体系统,并且在雄性为 ZZ,雌性为 ZW,性染色体组成呈雌异型。而在许多低等的脊椎动物中,温度决定性别的形成和分化,包括所有的鳄鱼和部分海龟。在这些动物中,缺少异型性染色体,性别极易变化并直接受到

孵化温度的控制。

性别决定基因是通过控制胚胎性腺的发育,即睾丸和卵巢的形成来实现性别决定的,尽管控制的方式有所不同,但脊椎动物性腺性别分化的形态变化是相对一致的,因此人们相信性别决定在遗传途径上也应该相对一致,只是

基金项目 中国博士后科学基金资助项目(No. 2003034267);

\* 通讯作者, E-mail: panyu@sjtu.edu.cn;

第一作者介绍 孟和,男,博士,副教授,研究方向:动物分子遗传, E-mail: menghe@sjtu.edu.cn.

收稿日期 2004-09-16, 修回日期 2004-12-29

在个别主要的调控点上有所不同而已。近年来人们对鸡性染色体特点、性激素对性别决定的影响等方面做了大量研究,尤其是参照哺乳动物性别决定研究成果,利用现代分子生物学手段克隆并分析了一些可能与鸡性别决定有关的基因序列及其结构特点、表达模式和功能,丰富了对性别决定问题的认识和理解。尽管如此,鸟类的性别决定机制还并不十分清楚。鸡生长发育和进化特点决定了其是进行性别决定机制研究理想的动物模型,而对性别决定基因结构、功能及其调控的研究也必将推动整个功能基因组研究的深入和发展。

## 1 鸡性染色体与性别决定

比较遗传图谱发现,鸟类同哺乳动物的性染色体(ZZ/ZW和XX/XY)并不同源,并且X/Y和Z/W来自不同的常染色体。SRY基因定位在哺乳动物的Y染色体上,它是哺乳动物所独有的,在鸟类没有发现SRY基因<sup>[1]</sup>。鸡的Z染色体相对较大,占单倍基因组的7.5%,主要含一些看家基因,也有一些有特殊功能的基因,包括一些雄性决定基因,如DMRT1。鸡Z染色体同人的9号染色体有很大的同源性,一些基因簇同人的染色体5、8、18同源。鸡的W染色体较小,占单倍基因组的1%,含大量的异染色质和许多含Xho I和EcoR I酶切位点的重复序列,它复制较晚并在减数分裂期同Z染色体很小的区域配对。

目前对鸡性别机制的理解,更多地倾向于Z染色体的剂量效应和W染色体的显性效应假说。该假说认为,Z染色体上携带雄性决定基因,且有剂量效应,即两个Z染色体时为雄性,一个Z染色体时为雌性;W染色体上携带着显性的卵巢决定基因,它具有显性效应而使ZW成为雌性。很多年以前在哺乳动物就发现Y染色体具有决定雄性的作用,其中比较有说服力的证据是在人类XXY个体为雄性(Klinefelter综合症),XO个体为雌性(Turner综合症)。在鸟类由于缺乏非整倍体的性染色体个体,所以难以验证Z的剂量和W显性假说。

这可能是由于非整倍体的性染色体是鸟类胚胎的致死因子,至少在ZO个体是这样的。目前三倍体性染色体鸡的证据支持Z剂量假说<sup>[2]</sup>。对三倍体鸡ZZW观察发现,在孵化期右侧发育成睾丸、左侧发育成卵巢体(包含睾丸和卵巢组织),生长发育早期表型为雌性,但性成熟后卵巢体中的卵巢组成部分退化,成体表型变为雄性<sup>[3]</sup>。根据观察结果推断,W染色体具有雌性作用但能被Z连锁雄性决定基因的剂量效应所抵抗。另外成体卵巢组织退化和表型变化显示,在三倍体鸡ZZW中W连锁的雌性决定不是显性的。

## 2 鸡性激素分泌与性别决定

在脊索动物,性别决定同类固醇生成的关联程度与进化程度有明显的关系,即进化程度越高,类固醇的性别决定作用越低。如在鱼、两栖类中,性腺的性别分化极易受雌激素和雄激素影响,在爬行动物、鸟类和有袋动物则易受雌激素影响。在哺乳动物真兽亚纲(鼠、人等),性腺性激素的合成和分泌发生在性腺性别分化之后,胚胎形成期性腺的发育呈现类固醇抗性,且在没有类固醇生成的情况下完成性腺分化,高度进化发育的胎盘和子宫可能具有削弱雌激素参与性别决定的功能而起到保护作用。

同哺乳动物真兽亚纲相比,鸟类性腺发育是易变的,更容易受到性激素尤其是雌激素的调控,这已经在通过向卵中注射雌激素或阻断雌激素产生从而诱导性别反转实验得到证明。用雌二醇处理雄性ZZ能使胚胎发育呈现雌性化,虽然这种效应不是永久的<sup>[4]</sup>。芳香化酶是雌激素合成途径中一个重要酶,用芳香化酶抑制剂处理性腺尚未分化的雌性ZW鸡胚,使鸡胚左侧卵巢雄性化,右侧性腺发育成睾丸,持久地诱导雌性向雄性的性反转<sup>[5]</sup>。基因表达研究发现,芳香化酶只表达在ZW雌性性腺,且是在强烈的性腺分化时期(6~6.5d,29~30期)。另外其他类固醇生成途径上游的酶类均表达在两性性腺髓质,而芳香化酶则只表达在雌性性腺的髓质,因此推断在雌性性别决定早期,W

连锁雌性决定基因很有可能是通过激活芳香化酶表达来决定雌性性腺分化发育的。鸡性腺雌激素受体 $\alpha$ 在性腺强烈分化时期在两性感腺表达的不对称性也很好地支持了这一推断<sup>[6]</sup>。另外,用睾酮和二氢睾酮处理雌性 ZW 鸡胚没有发现明显的性反转,而且雄激素受体表达发生在性腺发育晚期,也就是说目前还没有证据证明雄激素在鸡早期性腺分化中的功能和作用。

另一种激素——抗中肾旁管激素(Anti-Müllerian Hormone, AMH)同性别决定有着重要的联系。哺乳动物在性别分化过程中,雄性胚胎的睾丸支持细胞分泌抗中肾旁管激素,引起中肾旁管退化,间质细胞分泌睾酮导致中肾管发育成输精管、附睾、精囊和外生殖道,而由于雌性胚胎不分泌抗中肾旁管激素,中肾旁管可以发育成雌性生殖道。尽管如此,定向突变小鼠结果显示抗中肾旁管激素不是睾丸决定所必需的。鸡胚胎发育早期(5.5 d, 28 期)两性胚胎性腺均有抗中肾旁管激素表达,性腺抗中肾旁管激素的强烈表达先于性别分化,而且在雄性呈现更高的表达<sup>[7]</sup>。抗中肾旁管激素在两性感腺中这种表达上的差异是很重要的,既反映了它具有促进雄性中肾旁管退化和雌性右侧中肾旁管退化作用,也暗示了其可能具有更重要的功能,也就是具有促进睾丸分化和发育的能力。对抗中肾旁管激素参与性别决定的证据之一是性腺中的表达先于强烈的组织学分化和在两性感腺表达的不对称性。而另外一个间接证据是,当性别分化之前在 ZW 雌性胚胎上移植胚胎期睾丸能引发雌性向雄性性反转,结果两性性腺均能发育成睾丸<sup>[8]</sup>。

### 3 鸡性别决定相关的基因

SF1(orphan nuclear receptor steroidogenic factor-1)属于孤儿核激素受体家族。在哺乳动物, SF1 最初表达在两性感未分化的性腺,无义突变小鼠实验证明该基因是构成性腺和肾上腺原始细胞所必需的。在小鼠胚胎, SF1 在睾丸细胞分化时期持续表达,但在卵巢分化时期被下调,而且 SF1 在发育的雄性性腺同 SOX9 和 WT1 协同

调控抗中肾旁管激素基因的表达。也有证据显示 SF1 能够激活 SRY 基因的表达进而参与睾丸决定。这些结果显示, SF1 在性腺中具有双重作用,即未分化性腺的构成和稍晚些时间雄性性腺的分化。同哺乳动物一样, SF1 在鸡胚胎未分化早期(3.5 d, 22 期)表达于泌尿生殖器官中,此后随着不断发育表达位置集中在发育中的性腺和肾上腺。鸡胚胎 SF1 基因在两性感腺中更高地表达在卵巢,在雌性最高表达在 6.5 d(30 期)且一直维持到 8.5 d(35 期)<sup>[9]</sup>,此时在雄性性腺只有微弱表达。这种在雌性性腺高表达也许同卵巢中高水平合成性激素有关,因为在鸟类卵巢中类固醇的活性比睾丸中的要高很多。推测 SF1 有可能激活芳香化酶基因的表达进而增加雌激素的分泌,因为 SF1 是包括芳香化酶在内的类固醇生成酶基因的激活因子,而且已证明在芳香化酶基因启动子区存在 SF1 的结合位点,并且在鸡卵巢分化时期两个基因在性腺髓质中均有较高的表达<sup>[10]</sup>。当然还有一种可能是芳香化酶催化生成的雌激素上调 SF1 基因的表达。SF1 在雄性性腺中微弱表达可能是为了调控抗中肾旁管激素,而抗中肾旁管激素在雌性性腺的表达将促使右侧性腺的退化。

DAX1(dosage sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia congenital, on the X chromosome, number 1)基因编码蛋白属于孤儿核激素受体家族。人类的 DAX1 基因定位在 X 染色体上,当发生不正常复制时,其结果发生雄性到雌性的性反转<sup>[11]</sup>。DAX1 基因发生功能性突变能引起肾上腺发育不全<sup>[12]</sup>。小鼠 DAX1 表达在早期尚未分化的两性性腺中,在性腺开始分化时,其持续表达在卵巢中,而在睾丸中表达下降。另外转 DAX1 基因小鼠发生雄性到雌性的性反转<sup>[13]</sup>。尽管如此,在正常情况下 DAX1 主要同配子形成和性腺内分泌发育有关,且这方面的作用远远大于性别决定。鸡和哺乳动物 DAX1 氨基酸序列有 63% 的同源性,但其氨基酸序列 N 端没有重复序列。推测哺乳动物和鸡同 DNA 结合的区域不同,或者是鸡 DAX1 干脆不同 DNA 结

合 尽管已经有实验证明哺乳动物 DAX1 能够同 DNA 结合。鸡 DAX1 定位在 1 号常染色体的长臂端,在性别分化时期在性腺被上调,在雌性性腺的表达略高于雄性性腺<sup>[4]</sup>。虽然鸡 DAX1 基因的表达模式整体上同小鼠类似,但其不像在小鼠中那样在睾丸强烈分化时期被下调。因此推测鸡 DAX1 可能在两性都有作用,大概与配子形成和类固醇生成有关。

SOX9 编码的蛋白同 SRY 一样同属于 SOX 转录因子家族。在哺乳动物、鸟类和爬行动物,SOX9 在组成和结构上保守并均呈现雄性特异性表达。在哺乳动物中的研究结果显示,SOX9 在睾丸发育时期有重要的功能,并且能同 SF1 和 WT1 共同作用从而激活抗中肾旁管激素的表达。对鸡 SOX9 的研究结果显示,其作用特点同哺乳动物并不完全一致,因为鸡抗中肾旁管激素的强烈表达时期(25 期)先于 SOX9(29~30 期)<sup>[5]</sup>,且这种表达模式同在进化上极为相近的非洲鳄鱼相同,也就是说在鸟类和鳄鱼体系,SOX9 不能像在哺乳动物那样启动抗中肾旁管激素的表达。

尽管目前在鸟类发现并克隆定位了许多可能同性别决定有关的基因,如上面所述的 SF1、SOX9、AMH 等等,且它们可能在性别决定的不同层次上发挥着不同的作用,但由于它们都不是性连锁基因,一定程度上决定了它们不可能在性别决定中起决定作用。近几年的研究发现了下列 3 个性连锁基因,并推测它们可能像哺乳动物中的 SRY 基因一样同鸡性别决定有着重要关联。它们分别是 Z 性染色体上的 DMRT1 基因和在 W 染色体上的 ASW 和 FET1 基因。

目前 DMRT1(DM-related transcription factor 1)被认为是哺乳动物重要的性别决定基因,由于它同果蝇和线虫中与雄性性别发育有重要关联的两个转录因子基因(doublesex 和 mab-3)同源,而且均具有同称为 DM 的 DNA 结合区结合而得名。人的 DMRT1 基因定位在第 9 号染色体的短臂端,另外在雄性向雌性性反转的病人中发现 DMRT1 基因缺失<sup>[6]</sup>。在人的胚胎中,DMRT1 在性别分化时期只表达在雄性性腺<sup>[7]</sup>。

与此相似,DMRT1 特异性表达在鼠胚胎的性腺,性别强烈分化期过后在雄性的表达远远高于雌性<sup>[8]</sup>。

鸡 DMRT1 基因定位在 Z 染色体上且与 W 染色体不同源。对鸡 DMRT1 基因表达的研究显示,DMRT1 特异性表达在胚胎的泌尿生殖系统,且在性腺分化时期或在此之前,DMRT1 在胚胎雄性性腺的表达要远远超过雌性性腺<sup>[9]</sup>。在雄性胚胎中,DMRT1 表达在髓质束中,这与其在睾丸形成中发挥作用,是相吻合的。另外,DMRT1 还强烈表达在雄性中肾旁管中<sup>[20]</sup>。总之,鸡 DMRT1 基因的表达模式反映了其在功能上同哺乳动物的一致性,但由于其表达在性别强烈分化期之前,推测还有其它因子参与启动睾丸生成。已有实验证明鸡 DMRT1 是迄今为止得到证实的最好的雄性决定候选基因<sup>[21-23]</sup>。

ASW 和 FET1 是新近发现的两个同性别决定功能相关基因,它们被定位在 W 染色体的长染色体的短臂端。ASW(avian sex-specific W-linked)基因编码同蛋白激酶抑制剂有部分同源的蛋白,也叫 WPKCI(on the W chromosome protein kinase C inhibitor),其编码的蛋白质属于核酸水解酶 HINT 超家族,但缺失重要的组氨酸三联体 HIT(histidine triad)框,这个框是 AMP 连接到赖氨酸上进行脱氢反应所必需的。WPKCI 在 W 染色体大约有 40 个重复,几乎在所有的鸟类 W 染色体上同源。在 Z 染色体上有一个拷贝的同源序列,称作 ZPKCI,它含有 HIT 框,并编码一个真实的 HINT 酶。WPKCI 强烈地表达在雌性鸡胚胎,特别是性腺,而 ZPKCI 则在两性胚胎表达量均较低<sup>[24]</sup>。由于 ZPKCI 编码的 HINT 蛋白能够被二聚体激活,所以产生了一种假说。这种假说认为:在雄性中 Z 染色体上的 ZPKCI 基因表达产物构成同源二聚体,该同源二聚体通过激活某个睾丸分化必需因子来调控性别;在雌性中 W 染色体上的 WPKCI 基因产物和 Z 染色体上的 ZPKCI 基因产物构成异源二聚体,该异源二聚体抑制了某些睾丸分化必需因子,或者是该异源二聚体(也许是 WPKCI 基因产物构成的同源二聚体)激活了卵巢决定因

子<sup>[25,26]</sup>。

最近 Reed 等人在筛选和比较了多个在鸡性腺表达的基因后,证实 FET1(female expressed transcript 1)基因可能是卵巢决定基因<sup>[27]</sup>。该基因虽然定位在 W 常染色质短臂端但同 ASW 没有关联,而且同 Z 染色体没有任何同源。它特异性表达在雌性泌尿生殖系统,在两性性腺的表达不对称,在左侧性腺明显地更高,而且恰好强烈表达在性别分化时期。FET1 编码含有一个信号序列和跨膜区的 434 个氨基酸残基的蛋白质,而且同任何已知基因没有同源性。根据上述情况推测各性连锁基因在性别决定的层次调控中起关键作用,而且同哺乳动物的 SRY 基因一样,经过长期的进化已经成为鸟类或鸟类和爬行动物所独有的性别决定基因。尽管我们推测 ASW 和 FET1 是卵巢决定的重要基因,但对它们同性别决定系统中其它一些基因的联系还知之甚少,例如它们同 aromatase 激活途径的联系等,有待于做进一步深入研究。另外,本研究小组新近对 FET1 基因进行了 PCR 和 Southern blot 检测,结果发现在雄性鸡基因组中也存在 FET1 基因,并非象 Reed 等人报道的那样 FET1 基因只存在于 W 染色体且同 Z 染色体没有任何同源。进一步的工作还在进行之中。

#### 4 展 望

鸟类性别决定虽然同哺乳动物一样由遗传决定,但是它还保留着一些低等脊椎动物的特性,如雌激素仍然起着关键的作用,是脊椎动物性别决定进化的转折点。它在性别决定上同哺乳动物的区别将拓宽对脊椎动物性别决定机制及其进化发展规律的理解。比较鸟类和哺乳动物发现,脊椎动物的性别决定过程是动态和易变的,少数关键基因在性别决定过程不同环节上同时具有多种功能。对鸡性腺分化发育研究一个重要的发现是,分子水平上性别分化先于形态上的性别分化,如上面提到的 DMRT1、ASW 和 FET1,其在两性性腺表达上的差异出现在胚胎发育早期(3.5 d),而性腺性别在组织学上的强烈分化则出现在 6.5 d。对鸟类性别决

定机制有多种从不同角度的认识 and 解释,而新近出现的鸡性别决定机制的假说<sup>[59,60]</sup>,主要着眼点则是 W 和 Z 染色体间功能性的相互作用。如果这些假说真的成立的话,那么鸟类和哺乳动物在性别决定机制就存在本质的不同,因为迄今为止在哺乳动物中还没有发现 Y 染色体(包括 SRY)同 X 染色体间有功能性互作。

鸡的胚胎发育时间短(21 d),人们对鸡胚胎发育过程中表型变化有了较为清楚的认识,体外培养、观察和干预鸡胚生长发育技术也已趋于成熟。尤其近年分子生物学理论和技术的飞速发展,人为地改变基因的表达和作用已成为可能,例如人们通过构建禽逆转录病毒载体和反义核酸技术成功地降低了目标基因的表达<sup>[28,29]</sup>。特别是新近出现的 RNA 干扰技术在胚胎发育、基因功能研究等方面无疑有着巨大的潜力<sup>[30]</sup>,而且也有实验证明其能够抑制鸡胚胎神经系统中目标基因的表达<sup>[31]</sup>。这些技术的发展和进步将会促进鸡的功能基因组研究<sup>[32]</sup>。另外,鸡的基因组测序工作已接近尾声,鸡的生物数据库如 BAC 文库和 EST 序列库在不断充实,如果将这些生物信息资源和胚胎学研究相结合,将会使鸡成为重要的研究模型,其作用将不仅仅局限于性别决定,而会延伸为整个功能基因组研究。

#### 参 考 文 献

- [1] Coriat A M, Muller U, Harry J L, et al. PCR amplification of SRY-related gene sequences reveals evolutionary conservation of the SRY-box motif. *PCR Methods Applic*, 1993, 2: 218 ~ 222.
- [2] Thome M, Sheldon B. Triploid intersex and chimeric chickens: useful models for studies of avian sex determination. In: Reed K C, Graves J A M eds. *Sex Chromosomes and Sex Determining Genes*. Chur, Switzerland Harwood Academic, 1993, 201 ~ 208.
- [3] Lin M, Thome M H, Martin I C A, et al. Development of the gonads in the triploid (ZZW and ZZZ) fowl, *Gallus domesticus*, and comparison with normal diploid males (ZZ) and females (ZW). *Reprod Fert Dev*, 1995, 7: 1185 ~ 1197.
- [4] Scheib D. Effects and role of estrogens in avian gonadal differentiation. *Differentiation*, 1983, 23: 87 ~ 92.
- [5] Elbrecht A, Smith R G. Aromatase enzyme activity and sex

- determination in chickens. *Science*, 1992, **255** :467 ~ 470.
- [ 6 ] Nakabayashi O, Kikuchi H, Kikuchi T, *et al.* Differential expression of genes for aromatase and estrogen receptor during gonadal development in chicken embryos. *J Molec Endocrinol*, 1998, **20** :193 ~ 202.
- [ 7 ] Nishikimi H, Kansaku N, Saito N, *et al.* Sex differentiation and mRNA expression of P450c17, P450arom and AMH in gonads of the chicken. *Molec Reprod Dev*, 2000, **55** :20 ~ 30.
- [ 8 ] Maraud R, Vergnaud O, Rashedi M. New insights on the mechanism of testis differentiation from the morphogenesis of experimentally induced testes in genetically female chicken embryos. *Am J Anat*, 1990, **188** :429 ~ 437.
- [ 9 ] Smith C A, Smith M J, Sinclair A H. Expression of chicken Steroidogenic factor-1 during gonadal sex differentiation. *Gen Comp Endocrinol*, 1999, **113** :187 ~ 196.
- [ 10 ] Yu R N, Masafumi I, Saunders T L, *et al.* Role of Ahch in gonadal development and gametogenesis. *Nat Genet*, 1998, **20** :353 ~ 357.
- [ 11 ] Bardoni B, Zanaria E, Guioli S, *et al.* A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. *Nat Genet*, 1994, **7** :497 ~ 501.
- [ 12 ] Zanaria E, Muscatelli F, Bardoni B *et al.* An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita. *Nature*, 1994, **372** :635 ~ 641.
- [ 13 ] Swain A, Narvarez V, Burgoyne P, *et al.* Dax1 antagonises Sry action in mammalian sex determination. *Nature*, 1998, **391** :761 ~ 767.
- [ 14 ] Smith C A, Clifford V, Western P S, *et al.* Cloning and expression of a DAX1 homologue in the chicken embryo. *J Mol Endocrinol*, 2000, **24** :23 ~ 32.
- [ 15 ] Kreidberg J A, Sariola H, Loring J M, *et al.* WT-1 is required for early kidney development. *Cell*, 1993, **74** :679 ~ 691.
- [ 16 ] Veitia R, Nunes M, Brauner R, *et al.* Deletions of distal 9p associated with 46, XY male to female sex reversal : definition of the breakpoints at 9p23.3-p24.1. *Genomics*, 1997, **41** :271 ~ 274.
- [ 17 ] Moniot B, Berta P, Scherer G, *et al.* Male specific expression suggests a role of DMRT1 in human sex determination. *Mech Dev*, 2000, **91** :323 ~ 325.
- [ 18 ] Raymond C S, Kettlewell J R, Hirsch B, *et al.* Expression of Dmrt1 in the genital ridge of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development. *Dev Biol*, 1999, **215** :208 ~ 220.
- [ 19 ] Shan Z, Nanda I, Wang Y, *et al.* Sex-specific expression of an evolutionarily conserved male regulatory gene, DMRT1, in birds. *Cytogenet Cell Genet*, 2000, **89** (3 ~ 4) :252 ~ 257.
- [ 20 ] Smith C A, McClive P J, Western P S, *et al.* Conservation of a sex-determining gene. *Nature*, 1999, **402** :601 ~ 602.
- [ 21 ] McQueen H, McBride D, Miele G, *et al.* Dosage compensation in birds. *Curr Biol*, 2001, **11** :253 ~ 257.
- [ 22 ] Kuroda Y, Arai N, Arita M, *et al.* Absence of Z-chromosome inactivation for five genes in male chickens. *Chrom Res*, 2001, **9** :457 ~ 468.
- [ 23 ] Smith C A, Katz M, Sinclair A H. DMRT1 is up-regulated in the gonads during female-to-male sex reversal in ZW chicken embryos. *Biol Reprod*, 2003, **68** :560 ~ 570.
- [ 24 ] Hori T, Asakawa S, Itoh Y, *et al.* Wpkci, encoding an altered form of PKCI, is conserved widely on the avian W chromosome and expressed in early female embryos : implication of its role in female sex determination. *Molec Biol Cell*, 2000, **11** :3645 ~ 3660.
- [ 25 ] Teranishi M, Shimada Y, Hori T, *et al.* Transcripts of the MHM region on the chicken Z chromosome accumulate as non-coding RNA in the nucleus of female cells adjacent to the DMRT1 locus. *Chrom Res*, 2001, **9** :147 ~ 165.
- [ 26 ] Pace H C, Brenner C. Feminizing chicks : a model for avian sex determination based on titration of Hint enzyme activity and the predicted structure of an Asw-Hint heterodimer. *Genome Biol*, 2003, **4** :18.
- [ 27 ] Reed K J, Sinclair A H. FET-1 : a novel W-linked, female specific gene upregulated in the embryonic chicken ovary. *Gene Exp Patterns*, 2003, **2** :83 ~ 86.
- [ 28 ] Logan M, Tabin C. Targeted gene misexpression in chick limb buds using avian replication-competent retroviruses. *Methods : A Companion to Methods in Enzymology*, 1998, **14** :407 ~ 420.
- [ 29 ] Kos R, Tucker R P, Hall R, *et al.* Methods for introducing morpholinos into the chicken embryo. *Dev Dyn*, 2003, **226** :470 ~ 477.
- [ 30 ] McManus M T, Sharp P A. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nature Rev*, 2002, **3** :737 ~ 747.
- [ 31 ] Pekarik V, Bourikas D, Miglino N, *et al.* Screening for gene function in chicken embryo using RNAi and electroporation. *Nature Biotech*, 2003, **21** :93 ~ 96.
- [ 32 ] Brown W R A, Hubbard S J, Tickle C, *et al.* The chicken as a model for large-scale analysis of vertebrate gene function. *Nature Rev*, 2003, **4** :87 ~ 98.