

# 两栖动物性别决定相关基因的研究进展

刘 佳 李忻怡 张育辉\*

陕西师范大学生命科学学院 西安 710062

**摘要:**两栖动物的性别决定机制主要包括遗传性别决定 (genetic sex determination, GSD) 和环境性别决定 (environmental sex determination, ESD)。近年来,在两栖动物性别决定和性腺分化机制的研究中,运用分子生物学技术探讨性别决定相关基因及其相互关系方面的研究已获得新的成果。本文通过对 *DMRT1*、*DAX1*、*SF1*、*SOX3*、*SOX9*、*FOXL2*、*CYP19*、*CYP17* 在两栖动物性别决定中作用的分析,显示 *DAX1*、*SF1*、*FOXL2*、*SOX3* 均参与芳香化酶基因转录的调节,其中 *FOXL2*、*SOX3* 促进了 *CYP19* 的表达,*DAX1*、*SF1* 则与 *CYP17* 的表达调节有关。这些结果提示,两栖动物性别决定相关基因通过作用于 *CYP19*、*CYP17* 的表达调控性别决定过程,基因和温度分别在 GSD 和 ESD 过程中通过影响雌、雄激素的水平而决定两栖动物性别。

**关键词:**两栖动物;性别决定;基因;温度

**中图分类号:**Q953 **文献标识码:**A **文章编号:**0250-3263(2011)06-134-07

## Sex Determination-related Genes in Amphibians

LIU Jia LI Xin-Yi ZHANG Yu-Hui\*

College of Life Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China

**Abstract:** The sexual phenotype of amphibians is determined either by chromosomal factors (genetic sex determination, GSD), or by environmental factors (environmental sex determination, ESD). Recently, new findings on the sex determination-related genes and their interactions have obtained by utilizing molecular biology methods. Several genes such as *DMRT1*, *DAX1*, *SF1*, *SOX3*, *SOX9*, *FOXL2*, *CYP19* and *CYP17* have been found to play roles in determining the sexual phenotype of amphibians, with *DAX1*, *SF1*, *FOXL2* and *SOX3* involved in transcriptional regulation of aromatase gene. *FOXL2* and *SOX3* promote *CYP19* expression. *DAX1* and *SF1* can influence *CYP17* expression. Sex-determination genes play their roles by acting on the expression of *CYP19* and *CYP17*. Both sex-determination related genes and temperature determine sex of amphibians by affecting estrogen and/or androgen levels.

**Key words:** Amphibians; Sex determination; Gene; Temperature

动物性别决定一直是生物研究的热点内容。哺乳类的性别由性染色体决定, Y 染色体性别决定区 (sex-determining region of Y-chromosome, SRY) 在性别决定中起着主导作用, *SOX9*、*SF1*、*WT1* 和 *DAX1* 等基因也参与了胚胎性别决定的过程<sup>[1]</sup>。鸟类的性别也是由基因决定的, *EFT1* 和 *DMRT1* 分别为雌性和雄性的性别决定候选基因<sup>[2]</sup>。爬行动物的一些

物种是遗传依赖性性别决定, 另一些则为温度依赖性性别决定, 其中温度可能通过控制性别基因表达或调节雌激素水平来决定性别<sup>[3]</sup>。

**基金项目** 国家自然科学基金项目 (No. 130770243);

\* 通讯作者, E-mail: yu-huizhang@163.com;

**第一作者介绍** 刘佳, 女, 硕士研究生; E-mail: liujia1986jj@sina.com。

收稿日期: 2011-07-03, 修回日期: 2011-09-22

鱼类性别决定和性腺分化方式差异很大,基因、环境因素、类固醇激素等多种因素参与了这一过程<sup>[4]</sup>。在两栖动物,性别决定包括两种机制,即环境性别决定和遗传性别决定<sup>[5]</sup>。前者主要指温度依赖性的性别决定,后者包括在染色体、基因等不同水平对性别决定的影响。迄今为止,两栖动物的性别决定机制仍存在众多的未知环节,其中基因对于性别影响的复杂性和不确定性成为研究的难点。例如在两栖动物的染色体上还没有找到与哺乳动物 *SRY* 功能类似的性别决定基因。由于两栖动物在系统进化中的特殊地位,对其性别决定机制的探讨在物种的遗传与进化、延续、繁衍和控制等研究均具有重要意义。

## 1 两栖动物的环境性别决定

在两栖动物,环境因素对早期胚胎发育具有重要的影响,其中温度是影响两栖动物性别决定的主要环境决定因子,被称为温度依赖性性别决定(temperature sex determination, TSD),性别决定的关键时期称为温度敏感期(temperature sensitive period, TSP)。在有尾目,对于欧非肋突蟾(*Pleurodeles walil*)、北非肋突蟾(*P. poireti*)和滞育小鲵(*Hynobius retardatus*)幼体进行高温暴露后,性别分化的结果差异较大,在北非肋突蟾<sup>[6]</sup>得到的全部是雌性个体,而在欧非肋突蟾<sup>[7]</sup>和滞育小鲵<sup>[8]</sup>全部为雄性个体。而将这些物种置于它们自然生存的温度范围内,得到的是接近 1:1 的性别比率。这一结论在非洲树蛙(*Hyperolius viridiflavus*)、西北蟾蜍(*Bufo boreas*)和非洲牛蛙(*Pyxicephalus adspersus*)等物种也得到证实<sup>[9]</sup>。然而,将滞育小鲵幼体暴露在 10℃ 低温下产生的全部为雌性个体<sup>[8]</sup>。将冠北蟾(*Triturus cristatus*)幼体置于室温 18 ~ 24℃ 下,性别比率接近 1:1,而高温有利于雄性化,低温有利于雌性化<sup>[10]</sup>。在无尾目,美洲林蛙(*Rana sylvatica*)幼体在 32℃ 生活 33 d 后产生 50% 雄性个体,其余个体出现不同程度的雄性化卵巢。在 30℃ 下饲养牛蛙(*R. catesbeiana*) 25 ~ 26 期蝌蚪 4 个月,生殖腺出现卵巢向精巢

不同程度的转化<sup>[11]</sup>。上述表明,至少在两栖动物的部分物种,温度能改变其性别,高温暴露可促使雌性雄性化。

## 2 两栖动物的遗传性别决定

**2.1 两栖动物的性染色体** 两栖动物具有 XX/XY 和 ZZ/ZW 两种性别决定系统,这两种性别决定系统已在许多物种被报道。在有尾目,大多数物种为 XX/XY 性别决定系统,然而用精巢/卵巢原基移植技术证明,美西螈(*Ambystoma mexicanum*)和虎纹钝口螈(*A. tigrinum*)为 ZZ/ZW 型性别决定系统<sup>[12]</sup>。在无尾目,普通蟾蜍(*B. bufo*)的同型配子(ZZ)为雄性,异型配子(ZW)是雌性。在非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)、非洲牛箱头蛙(*Pyxicephalus adspersus*)、德拉平跟蛙(*Tomopterna delalandii*)、普通蟾蜍、哈氏滑跖蟾(*Leiopelma hamiltoni*) 5 个种均为 ZZ/ZW 性别决定系统<sup>[13]</sup>,而黑斑蛙(*R. nigromaculata*)则为 XX/XY 性别决定系统<sup>[14]</sup>,粗皮蛙(*R. rugosa*)具有 XX/XY 和 ZZ/ZW 两种性别决定系统<sup>[15]</sup>。

**2.2 性别决定相关基因** 迄今为止,两栖动物的许多与性别分化相关的基因已被克隆,如常染色体基因 *DMRT1*、*SOX9*、*FOXL2* 等,性染色体基因 *DAX1*、*SF1*、*SOX3* 等。其中 *DMRT1* 和 *DAX1* 对雄性性别决定有重要作用,而 *SOX3* 和 *FOXL2* 则与雌性的性别决定密切相关。所以,这些基因都有可能是两栖动物的性别决定基因,在性别分化的过程中它们在雌雄两性之间表现出差异性表达。

**2.2.1 *DMRT1*** *DMRT* (doublesex- and mab-3-related transcription factor) 基因家族编码一类转录调控因子,其蛋白都包含一个具有 DNA 结合能力的保守基序 DM 结构域<sup>[16]</sup>。在黑斑蛙和粗皮蛙成体,*DMRT1* 仅在精巢专一表达,不在其他组织表达<sup>[17-18]</sup>。表明 *DMRT1* 可能参与精子发生过程,对其他器官的发育不具有直接作用。并且,在粗皮蛙,*DMRT1* 最早在分化状态的精巢中表达,此时精原细胞仍属于较原始的生殖细胞,然而,未发现 *DMRT1* 在卵细胞表

达。若给有良好分化卵巢的雌性 (XX) 粗皮蛙蝌蚪注射睾酮, 促使它发生性逆转, 在其性腺中可检测到 *DMRT1* 基因表达。而且, 在性逆转雄性 (XX-neomales) 的性腺中, *DMRT1* 的表达也同样上调<sup>[18]</sup>。这暗示 *DMRT1* 对雄性的性腺分化具有专一性, 与精巢的发育有特异性相关。

**2.2.2 DAX1** *DAX1* (dosage sensitive sex-reversal-adrenal hypoplasia congenita-critical region of the X chromosome, gene 1) 基因编码孤儿核受体 *DAX1*, 在人类 (*Homo sapiens*) 属于伴 X 基因。它的重复会导致 XY 型个体的性别逆转。*DAX1* 是重要的转录抑制因子之一, *DAX1* 基因突变将导致人类的先天性肾上腺发育不全<sup>[19]</sup>。*DAX1* 可能通过与 *SF1* 相互作用抑制 *SF1* 和 *WT1* 的相互作用<sup>[20-21]</sup>。

在粗皮蛙, *DAX1* 序列全长 1.0 kb, 编码 287 个氨基酸。*DAX1* 在 12 期胚胎开始表达, 在 X 期蝌蚪表达变强, 在刚完成变态的幼蛙, *DAX1* 在精巢的转录水平比卵巢中高。在变态后 2 个月的幼蛙, *DAX1* 仅在精巢中表达。在雌蛙, 随着卵巢的发育, *DAX1* 的转录水平逐渐下降。在通过腹腔注射睾酮导致雌性逆转为雄性的粗皮蛙, *DAX1* 的表达先下降, 后迅速上升<sup>[22]</sup>。可见 *DAX1* 基因与两栖动物精巢的发育过程密切相关。

**2.2.3 SF1** *SF1* (steroidogenic factor 1) 基因编码孤儿核受体 *SF1*, *SF1* 蛋白含有由两个锌指构成的 DNA 结合域。在粗皮蛙, *SF1* 位于 W 染色体的短臂和 Z 染色体的长臂<sup>[23]</sup>。*SF1* 是类固醇激素合成的关键调节因子, 在所有合成类固醇的细胞中表达。在粗皮蛙成体, *SF1* mRNA 在精巢、脑、肾上腺、肾和脾中表达<sup>[24]</sup>。*SF1* 调节多种与类固醇生成相关的基因, 包括与雌二醇及睾酮生成相关的芳香化酶基因和 3 $\beta$ -羟类固醇脱氢酶的基因。在牛蛙, *SF1* 蛋白在脑、垂体、性腺、肝等与类固醇合成和生殖相关的组织中高表达, 而在皮肤和肠道等非生殖组织中几乎不表达。在牛蛙性腺的性别分化中, *SF1* 在雌雄两性之间表现出明显的差异性表达, 在精巢结构中低水平表达, 而在卵巢中高

水平表达<sup>[25]</sup>。在爬行动物, *SF1* 在性别决定前的性腺原基中表达, 其雌雄之间的差异表达在不同的物种并不一致。在红耳龟 (*Trachemys scripta*) 的温度敏感期, 雄性的 *SF1* 表达水平稳定, 而在雌性中下降<sup>[26]</sup>。然而, 在美洲短吻鳄 (*Alligator mississippiensis*) 的温度敏感期, *SF1* 的表达水平在雌性保持不变, 而在雄性下降。短吻鳄卵巢中 *SF1* 表达水平高于精巢, 很可能与胚胎期卵巢中类固醇生成活性较高有关。此外, 由于短吻鳄中芳香化酶对卵巢的发育至关重要, *SF1* 在卵巢中的高水平表达可能刺激芳香化酶的表达, 进而促进卵巢的发育<sup>[27]</sup>。由此可见, *SF1* 是影响性腺分化和性别决定的重要基因。

**2.2.4 SOX3, SOX9** *SOX* (sry-like HMG box) 基因家族是一类编码转录因子的基因家族, 不同成员与不同发育过程相关<sup>[28]</sup>。例如, *SOX3* 位于人类和有袋类动物的 X 染色体上, 参与配子发生。*SOX3* 虽然不是性别决定所必须的, 但是对卵母细胞的正常发育和雄性睾丸分化非常重要<sup>[29]</sup>。

在粗皮蛙, *SOX3* 位于性染色体上, 在雌性蝌蚪的性腺中高水平表达, 可能是上调 *CYP19* 表达的调控因子<sup>[30]</sup>。在粗皮蛙蝌蚪性腺分化的前、中、后 3 个时期, *SOX3* 和 *CYP19* 在雌性的性腺均高水平表达, 表明 *SOX3* 促进 *CYP19* 的表达。粗皮蛙卵巢中调节 *CYP19* 表达的因子与人类卵巢中不同。定点诱变时, 在 *CYP19* 启动子区域中 -57 结合位点对 *SOX3* 反应性是至关重要的。有趣的是, 缺乏 HMG box 区的 *SOX3* 不能促进 *CYP19* 转录。在爪蟾的 A6 细胞, *SOX3* 可激活 *CYP19* 的表达<sup>[31]</sup>。上述结果表明, *SOX3* 是促使未分化性腺发育为卵巢的一个重要因素, *SOX3* 通过 HMG box 直接结合 *CYP19* 的启动子区域上相应的结合位点, 激活 *CYP19* 转录。

*SOX9* 在人类胚胎发生早期性腺的体细胞表达, 对于哺乳类睾丸发育是必须的。在两栖类, *SOX9* 在雌雄性腺中表达的差异仅出现在发育后期, 所以可能与性别决定无关, 而与性腺

结构的分化有关。例如,在 56 期的欧非肋突蟾幼体,*SOX9* 仅在精巢中表达,而在成体的精巢和卵巢均表达。在雌性卵母细胞发育的各个时期,卵质中都可检测到 *SOX9* 表达,但在胞核中没有检测到<sup>[32]</sup>。在爪蟾,*SOX9* mRNA 首先在变态后分化良好的性腺中可检测到。在精巢,*SOX9* 表达仅限于 Sertoli 细胞核,这与在其他脊椎动物所报道的结果相似,显示 *SOX9* 在脊椎动物睾丸分化中的保守性。在卵巢,*SOX9* 蛋白在卵黄合成前期位于卵母细胞的胞质中,在卵黄合成前期转移到细胞核<sup>[33]</sup>。表明 *SOX9* 不是爪蟾的性别决定基因,但在精巢和卵巢分化中具有不同的功能。

**2.2.5 FOXL2** *FOX* (forkhead box) 基因家族在脊椎动物中高度保守,其中 *FOXL2* 在卵巢的早期发育中有重要的调节作用<sup>[34]</sup>。在粗皮蛙,在性别决定前的雌性(ZW)蝌蚪性腺中 *FOXL2* 的表达上调。同时 A6 细胞的荧光素酶分析证明,*FOXL2* 可促进爪蟾肾上皮细胞中 *CYP19* 表达<sup>[35]</sup>。在红耳龟的促雌性化温度下,*FOXL2* 在胚胎期性腺中的表达水平增高,可能促进雌性早期发育的性腺<sup>[36]</sup>。综上分析,*FOXL2* 在性别决定前的未分化性腺中表达,它在雌性的表达水平高于雄性。*FOXL2* 可能是 *CYP19* 的调节因子,上调 *CYP19* 的表达。

**2.3 性类固醇激素合成的相关基因** 在类固醇生成过程中, *CYP11A1*、*3 $\beta$ HSD*、*CYP17*、*17 $\beta$ HSD*、*CYP19* 和 *5 $\alpha$ Red* 共 6 种类固醇代谢酶是性类固醇激素生成所必须的,其中 *CYP19* 使雄烯二酮及睾酮等雄激素转化为雌酮和雌二醇,在雄激素向雌激素转化中具有关键作用;而 *CYP17* 则使孕烯醇酮转化为脱氢异雄酮和睾固酮,在雌激素向雄激素转化中起作用。在性别决定过程中,*CYP11A1*、*3 $\beta$ HSD*、*17 $\beta$ HSD* 和 *5 $\alpha$ Red1* 在两性之间均未出现差异性表达,因此这些基因对两栖动物性别决定是否有影响还有待进一步的研究。但 *CYP17* 的表达发生在粗皮蛙未分化的性腺中,在雄性的转录水平明显高于雌性,而 *CYP19* 在雌性性腺中的转录水平明显高于雄性<sup>[37]</sup>。同时,上述研究也表明,

*DAX1*、*SF1*、*FOXL2*、*SOX3* 均参与芳香化酶基因 *CYP19* 和 *CYP17* 的调节。其中 *FOXL2* 和 *SOX3* 促进了 *CYP19* 的表达,*DAX1* 和 *SF1* 则与 *CYP17* 的表达有关。这些结果设想两栖动物性别决定相关基因很可能通过作用于 *CYP19*、*CYP17* 的表达来参与性别决定过程。

**2.3.1 CYP19** *CYP19* 是编码芳香化酶(P450arom)的基因,人类的 *CYP19* 作为单倍体基因组的单拷贝存在,位于染色体 15q2111 区带,它含有约 30 kb 的编码区和 93 kb 的调节区。P450arom 主要在脑和性腺中产生,负责将雄激素转化为雌激素。在某些非哺乳动物,芳香化酶的水平或活性可参与决定性别分化。

性类固醇激素对许多脊椎动物的性逆转有关键作用,雌激素可导致鱼类、两栖类和爬行类许多物种的雄性逆转为雌性。在欧非肋突蟾,室温下饲养雌性幼体在 51 期后 *CYP19* 表达水平迅速增高,到 54 期性腺开始分化为精巢或卵巢。ZW 幼体性腺中的 *CYP19* 表达高于 ZZ 幼体。在温度敏感期,高温暴露欧非肋突蟾幼体会诱导雌性向雄性的性逆转,同时类固醇生成酶 *CYP19* 的活性下降。表明欧非肋突蟾在温度敏感期间或之后,性腺内的雌激素可能影响性腺分化;*CYP19* 表达水平在促雌性化温度下比促雄性化温度下高<sup>[38]</sup>。在粗皮蛙,*CYP19* 基因是常染色体基因<sup>[39]</sup>,表达在雌性性别决定时的性腺中是上调的。研究还表明,*CYP19* 在粗皮蛙 XX 雌性向雄性性逆转的性腺中是上调的<sup>[40]</sup>。其他物种 *CYP19* 在性腺分化中的上调也被报道,例如罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)<sup>[41]</sup>、欧非肋突蟾<sup>[42]</sup>、棱皮龟 (*Dermodochelys coriacea*)<sup>[43]</sup>、红耳龟<sup>[44]</sup> 和红原鸡 (*Gallus gallus*)<sup>[45]</sup>。上述表明,*CYP19* 对脊椎动物卵巢分化至关重要,并且对雌性未分化性腺中雄激素向雌激素的转化起关键作用。

**2.3.2 CYP17** *CYP17* (P450c17 or 17 $\alpha$ -hydroxylase/17, 20-lyase) 基因在粗皮蛙位于第 9 号染色体上,为常染色体基因,在卵巢和精巢都有表达<sup>[46]</sup>。虽然 *CYP17* 酶在非哺乳脊椎动物性腺的性别分化中的作用还不十分确定,但

在性腺和肾上腺中,CYP17 被认为是类固醇合成途径中的关键酶,它虽为一种蛋白,但具有 17 $\alpha$ -羟化酶和 C17, 20 裂解酶的活性,参与合成 C-18、C-19 和 C-21 类固醇<sup>[46]</sup>。

原位杂交显示,CYP17 在粗皮蛙的精巢和雄性未分化性腺中都存在。给粗皮蛙蝌蚪注射睾丸激素促进雌性向雄性转化,在注射后 16、24 天,CYP17 的表达明显增强。可见 CYP17 参与精巢的形成<sup>[47]</sup>。在爪蟾的卵母细胞,CYP17 mRNA 转录水平很高,它们通过 CYP17 酶产生性成熟所需要的雄激素<sup>[48]</sup>。在性腺分化过程中,CYP17 在未分化性腺的细胞中合成,在雄性,孕酮转化为雄烯二酮的过程中活性较高。

在青鳉鱼(*Oryzias latipes*),P450c17 有 I、II 两种类型,原位杂交显示,在排卵前 48 h 卵母细胞的成熟中,P450c17 I 与雌二醇的生成相关,而 P450c17 II 与二氢孕酮和前肾中皮质醇的生成相关。P450c17 I 具有 17 $\alpha$ -羟化酶和 C17, 20 裂解酶活性,P450c17 II 仅有 17 $\alpha$ -羟化酶活性<sup>[49]</sup>。但是,CYP17 酶的两类型在两栖类中至今还未被报道。

综上所述,CYP17 在精巢形成过程中具有十分重要的调节作用,并且对雄性未分化性腺中雌激素向雄激素的转化起关键作用。然而,CYP17 也是粗皮蛙的一个常染色体基因,上调或下调其表达的因子,有待于进一步研究。

### 3 结语——温度、基因和性激素在性腺分化中的关系

在两栖动物,温度、基因和激素对性别决定和性腺分化都有直接或间接的影响。大量的研究证实,两栖动物性类固醇激素影响性腺分化和性腺发育,雌二醇可诱导雄性转为雌性,睾酮可诱导雌性转为雄性。在鸟类胚胎发育早期,雌雄性腺的发育与雌激素有关,然而在性腺分化的中后期,合成雌激素是雌性特有的能力,说明在卵巢发育中雌激素具有关键作用<sup>[50]</sup>。所以认为,性类固醇激素是影响性腺分化的直接因素。

在性类固醇激素合成过程中,CYP19 和

CYP17 是参与雌激素和雄激素生成的关键基因,调节雌、雄激素的转化。CYP19 在分化中的雌性性腺中表达增加,CYP17 则在雄性性腺中表达增加,表明类固醇生成相关基因可通过影响性类固醇激素的水平而影响性腺分化,所以与性别决定密切相关。对 *DMRT1*、*DAX1*、*SF1*、*SOX3*、*SOX9*、*FOXL2*、*CYP19*、*CYP17* 在两栖动物性别决定中作用的分析,显示 *FOXL2*、*SOX3*、*DAX1*、*SF1* 均参与芳香化酶基因转录的调节,其中 *FOXL2*、*SOX3* 促进了 *CYP19* 的表达,*DAX1*、*SF1* 则与 *CYP17* 的表达调节有关。

*FOXL2*、*SOX3*、*DAX1*、*SF1* 基因对两栖动物的性别决定产生重要影响,虽然它们在其他脊椎动物已经被确定为性别决定基因,但由于研究条件的差异,在两栖动物的性别决定中这些基因还有待更多实验确认,所以称之为性别决定相关基因。性别决定基因的鉴定和分析对于探讨两栖动物性别决定至关重要,但性别不可能由某一个或几个基因决定,或许是由许多相关基因共同作用的。其中一些基因促进卵巢的分化,而另一些基因则促进精巢的分化,还有一些基因可能对卵巢和精巢的分化都有影响。在两栖动物如果存在性别决定基因,设想它可能调节芳香化酶基因 *CYP19*、*CYP17* 的转录,后者则通过影响雌、雄激素的水平控制性腺分化为精巢或卵巢。

研究表明,在爬行动物的许多物种,孵化温度决定子代的性别。孵化温度和性类固醇激素均能够引发雌雄性别决定。温度通过作用于性类固醇激素合成酶及其受体的基因来决定性别<sup>[51]</sup>。在两栖动物,自然温度不会导致雌雄性别比率产生大的差异。低温可产生雌性个体,高温则也可产生雄性个体,其机制可能与爬行动物相似。所以,基因和温度分别在 GSD 和 ESD 过程中,均可通过影响雌、雄激素的水平而决定两栖动物性别。然而,温度是通过影响酶活性直接影响类固醇合成还是影响某些相关基因的表达,还有待更多的证据。

### 参 考 文 献

[1] 邓译,王金星. 哺乳动物性别决定的分子要素. 动物

- 学杂志, 1998, 33(5): 51-55.
- [ 2 ] Smith C A, Katz M, Sinclair A H. DMRT1 is upregulated in the gonads during female-to-male sex reversal in ZW chicken embryos. *Biol Reprod*, 2003, 68(2): 560-570.
- [ 3 ] 焦保卫, 王德寿, 邓思平. 爬行动物温度依赖性性别决定研究进展. *动物学杂志*, 2002, 37(4): 74-78.
- [ 4 ] Baroiller J F, D' Cotta H. Environment and sex determination in farmed fish. *Comp Biochem Physiol C*, 2001, 130(4): 399-409.
- [ 5 ] Nakamura M. Sex determination in amphibians. *Semin Cell Dev Biol*, 2009, 20(3): 271-282.
- [ 6 ] Dournon C, Guillet F, Boucher D, et al. Cytogenetic and genetic evidence of male sexual inversion by heat treatment in the newt *Pleurodeles poireti*. *Chromosoma*, 1984, 90(4): 261-264.
- [ 7 ] Dournon C, Houillon C. Demonstration génétique de l' inversion fonctionnelle du phénotype sexuel femelle sous l' action de la température d' élevage chez l' Amphibien Urodèle: *Pleurodeles waltlii* Michah. *Reprod Nutr Dev*, 1984, 24: 361-378.
- [ 8 ] Uchida T. Studies on the sexuality of amphibia; III. Sex transformation in *Hynobius retardatus* by the function of high temperature. *J Fac Sci Hokkaido Imp Univ*, 1937, 6(1): 59-70.
- [ 9 ] Hayes T B. Sex determination and primary sex differentiation in amphibians; genetic and developmental mechanisms. *J Exp Zool*, 1998, 281(5): 373-399.
- [ 10 ] Wallace H, Wallace B M. Sex reversal of the newt *Triturus cristatus* reared at extreme temperatures. *Int J Dev Biol*, 2000, 44(7): 807-810.
- [ 11 ] Hsü C Y, Yü N W, Liang H M. Induction of sex reversal in female tadpoles of *Rana catesbeiana* by temperature treatment. *Endocrinol Jpn*, 1971, 18(3): 243-251.
- [ 12 ] Humphrey R R. Male homogamety in the *Mexican axolotl*: a study of the progeny obtained when germ cells of a genetic male are incorporated in a developing ovary. *J Exp Zool*, 1957, 134(1): 91-101.
- [ 13 ] Schmid M, Nanda I, Steinlein C, et al. Amphibian cytogenetics and evolution // Green D M, Sessions S K. Sex Determining Mechanisms and Sex Chromosomes in Amphibia. New York: Academic Press, 1991: 393-428.
- [ 14 ] 吴鹤龄, 张任培. 应用 BrdU-Hoechst33258-Giemsa 技术对黑斑蛙性染色体的研究. *遗传学报*, 1985, 12(6): 462-469.
- [ 15 ] Miura I. An evolutionary witness: the frog *Rana rugosa* underwent change of heterogametic sex from XY male to ZW female. *Sex Dev*, 2007, 1(6): 323-331.
- [ 16 ] Raymond C S, Shamu C E, Shen M M, et al. Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. *Nature*, 1998, 391(6668): 691-695.
- [ 17 ] 季代丽, 李洁, 刘先英, 等. 黑斑蛙 *Dmrt1* 基因的克隆及在不同组织中的表达. *应用与环境生物学报*, 2005, 11(2): 198-201.
- [ 18 ] Shibata K, Takase M, Nakamura M. The *Dmrt1* expression in sex-reversed gonads of amphibians. *Gen Comp Endocrinol*, 2002, 127(3): 232-241.
- [ 19 ] Goodfellow P N, Camerino G. *DAX-1*, an 'antitestis' gene. *Cell Mol Life Sci*, 1999, 55(6/7): 857-863.
- [ 20 ] Nachtigal M W, Hirokawa Y, Enyeart-VanHouten D L, et al. Wilms' tumor 1 and *DAX-1* modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression. *Cell*, 1998, 93(3): 445-454.
- [ 21 ] Ikeda Y, Takeda Y, Shikayama T, et al. Comparative localization of *DAX-1* and *Ad4BP/SF-1* during development of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis suggests their closely related and distinct functions. *Dev Dyn*, 2001, 220(4): 363-376.
- [ 22 ] Sugita J, Takase M, Nakamura M. Expression of *Dax-1* during gonadal development of the frog. *Gene*, 2001, 280(1/2): 67-74.
- [ 23 ] Uno Y, Nishida C, Oshima Y, et al. Comparative chromosome mapping of sex-linked genes and identification of sex chromosomal rearrangements in the Japanese wrinkled frog (*Rana rugosa*, Ranidae) with ZW and XY sex chromosome systems. *Chromosome Res*, 2008, 16(4): 637-647.
- [ 24 ] Kawano K, Miura I, Morohashi K, et al. Molecular cloning and expression of the *SF-1/Ad4BP* gene in the frog, *Rana rugosa*. *Gene*, 1998, 222(2): 169-176.
- [ 25 ] Mayer L P, Overstreet S L, Dyer C A, et al. Sexually dimorphic expression of steroidogenic factor 1 (SF-1) in developing gonads of the American bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Gen Comp Endocrinol*, 2002, 127(1): 40-47.
- [ 26 ] Fleming A, Wibbels T, Skipper J K, et al. Developmental expression of steroidogenic factor 1 in a turtle with temperature-dependent sex determination. *Gen Comp Endocrinol*, 1999, 116(3): 336-346.
- [ 27 ] Western P S, Harry J L, Marshall Graves J A, et al. Temperature-dependent sex determination in the American alligator: expression of *SF1*, *WT1* and *DAX1* during gonadogenesis. *Gene*, 2000, 241(2): 223-232.
- [ 28 ] Wright E M, Snopek B, Koopman P. Seven new members

- of the Sox gene family expressed during mouse development. *Nucleic Acids Res*, 1993, 21(3): 744.
- [29] Weiss J, Meeks J J, Hurley L, et al. *Sox3* is required for gonadal function, but not sex determination, in males and females. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(22): 8084 – 8091.
- [30] Uno Y, Nishida C, Yoshimoto S, et al. Diversity in the origins of sex chromosomes in anurans inferred from comparative mapping of sexual differentiation genes for three species of the Raninae and Xenopodinae. *Chromosom Res*, 2008, 16(7): 999 – 1011.
- [31] Oshima Y, Naruse K, Nakamura Y, et al. *Sox3*: a transcription factor for *Cyp19* expression in the frog *Rana rugosa*. *Gene*, 2009, 445(1/2): 38 – 48.
- [32] Dumond H, Al-Asaad I, Chesnel A, et al. Temporal and spatial *SOX9* expression patterns in the course of gonad development of the caudate amphibian *Pleurodeles waltl*. *J Exp Zool B*, 2011, 316(3): 199 – 211.
- [33] El Jamil A, Kanhoush R, Magre S, et al. Sex-specific expression of *SOX9* during gonadogenesis in the amphibian *Xenopus tropicalis*. *Dev Dyn*, 2008, 237(10): 2996 – 3005.
- [34] Lehmann O J, Sowden J C, Carlsson P, et al. Fox's in development and disease. *Trends Genet*, 2003, 19(6): 339 – 344.
- [35] Oshima Y, Uno Y, Matsuda Y, et al. Molecular cloning and gene expression of *Foxl2* in the frog *Rana rugosa*. *Gen Comp Endocrinol*, 2008, 159(2/3): 170 – 177.
- [36] Loffler K A, Zarkower D, Koopman P. Etiology of ovarian failure in blepharophimosis ptosis epicanthus inversus syndrome: *FOXL2* is a conserved, early-acting gene in vertebrate ovarian development. *Endocrinology*, 2003, 144(7): 3237 – 3243.
- [37] Maruo K, Suda M, Yokoyama S, et al. Steroidogenic gene expression during sex determination in the frog *Rana rugosa*. *Gen Comp Endocrinol*, 2008, 158(1): 87 – 94.
- [38] Chardard D, Desvages G, Pieau C, et al. Aromatase activity in larval gonads of *Pleurodeles waltl* (Urodele Amphibia) during normal sex differentiation and during sex reversal by thermal treatment effect. *Gen Comp Endocrinol*, 1995, 99(1): 100 – 107.
- [39] Oshima Y, Kato T, Wang D, et al. Promoter activity and chromosomal location of the *Rana rugosa* P450 aromatase (*CYP19*) gene. *Zool Sci*, 2006, 23(1): 79 – 85.
- [40] Kato T, Matsui K, Takase M, et al. Expression of P450 aromatase protein in developing and in sex-reversed gonads of the XX/XY type of the frog *Rana rugosa*. *Gen Comp Endocrinol*, 2004, 137(3): 227 – 236.
- [41] Ijiri S, Kaneko H, Kobayashi T, et al. Sexual dimorphic expression of genes in gonads during early differentiation of a teleost fish, the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Bio Reprod*, 2008, 78(2): 333 – 341.
- [42] Kuntz S, Chardard D, Chesnel A, et al. Steroids, aromatase and sex differentiation of the newt *Pleurodeles waltl*. *Cytogenet Genome Res*, 2003, 101(3/4): 283 – 288.
- [43] Desvages G, Pieau C. Aromatase activity in gonads of turtle embryos as a function of the incubation temperature of eggs. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1992, 41(3/8): 851 – 853.
- [44] Ramsey M, Shoemaker C, Crews D. Gonadal expression of *Sfl* and aromatase during sex determination in the red-eared slider turtle (*Trachemys scripta*), a reptile with temperature-dependent sex determination. *Differentiation*, 2007, 75(10): 978 – 991.
- [45] Shimada K. Gene expression of steroidogenic enzymes in chicken embryonic gonads. *J Exp Zool*, 1998, 281(5): 450 – 456.
- [46] Sakurai N, Maruo K, Haraguchi S, et al. Immunohistochemical detection and biological activities of *CYP17* (P450c17) in the indifferent gonad of the frog *Rana rugosa*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2008, 112(1/3): 5 – 12.
- [47] Iwade R, Maruo K, Okada G, et al. Elevated expression of *P450c17* (*CYP17*) during testicular formation in the frog. *Gen Comp Endocrinol*, 2008, 155(1): 79 – 87.
- [48] Lutz L B, Cole L M, Gupta M K, et al. Evidence that androgens are the primary steroids produced by *Xenopus laevis* ovaries and may signal through the classical androgen receptor to promote oocyte maturation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(24): 13728 – 13733.
- [49] Zhou L Y, Wang D S, Shibata Y, et al. Characterization, expression and transcriptional regulation of *P450c17*-I and -II in the medaka, *Oryzias latipes*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 362(3): 619 – 625.
- [50] Smith C A, Andrews J E, Sinclair A H. Gonadal sex differentiation in chicken embryos: expression of estrogen receptor and aromatase genes. *J Steroid Biochem*, 1997, 60(5/6): 295 – 302.
- [51] Crews D. Temperature-dependent sex determination: the interplay of steroid hormones and temperature. *Zool Sci*, 1996, 13(1): 1 – 13.