

DOI: 10.1360/yc-007-0081

鸟类性别决定候选基因在性反转鸡胚中的表达

郑江霞, 杨宁

中国农业大学动物科技学院, 北京 100094

摘要: *DMRT1*、*PKCIW* 和 *FET1* 是鸟类性别决定过程中重要的候选基因。以芳香化酶抑制剂处理的鸡胚为实验材料, 对这 3 个基因的表达变化进行了研究。结果表明, 在整个性别决定关键时期(E4.5 ~ E10.5), *DMRT1* 在雄性的表达量显著高于雌性, 并且在 ZW 性反转鸡胚中表达大幅上升, 表明 *DMRT1* 的上调表达是与睾丸形成相关的。*PKCIW* 基因在雌性特异表达并在性反转鸡胚表达上升, 这可能与其特殊作用模式有关, 即使性反转鸡胚 *PKCIW* 代偿性的表达升高, 却也未能见阻止睾丸的形成。此外, *FET1* 为雌性特异表达, 但在性反转鸡胚中表达无变化。综上, 实验结果支持了 *DMRT1* 是鸟类睾丸发育决定因子的假说。

关键词: *DMRT1*; *PKCIW*; *FET1*; 性反转鸡; 鸟类性别决定

mRNA expression of genes related to avian sex determination during female-to-male sex reversal in ZW chicken embryos

ZHENG Jiang-Xia, YANG Ning

College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100094, China

Abstract: *Dsx* and *mab-3*-related transcription factor (*DMRT1*), Protein kinase C inhibitor (*PKCIW*) and Female-specific expression transcription factor (*FET1*) have been regarded as critical candidates of avian sex determination. Their mRNA expression was analyzed in chicken embryos during experimentally induced female-to-male sex-reversal by an aromatase inhibitor (AI) fadrozole. *DMRT1* expression was higher in male (ZZ) gonads than in female (ZW) gonad prior to and throughout the period of sex differentiation. However, female-to-male sex-reversed ZW embryos showed elevated levels of *DMRT1* expression similar to those of normal males, indicating that *DMRT1* was associated with testis development. *PKCIW* gene expression was dimorphic between male and female gonads, and was up-regulated in AI-treated female embryos. This finding might account for the specific effect of *PKCIW*, functioning via heterodimerization with PKCI during avian sex determination. However, its elevated expression appeared to be insufficient to induce ovary development. On the other hand, *FET1* expression was female-specific and unchanged in AI-treated female embryos. Results of present experiment suggested that *DMRT1* is a determinant for testis development in birds.

Keywords: *DMRT1*; *PKCIW*; *FET1*; sex-reversed chicken; avian sex determination

鸡和其他鸟类与哺乳动物不同, 是由ZZ:ZW性染色体系统来决定性别的。此外, 鸟类与低等脊椎动物相类似, 性别分化易于受到外界环境(如性激素)的影响。雌激素处理或者是阻断雌激素的合成都可

以诱导个体产生性反转, 通过抑制雌激素合成酶—芳香化酶的活性, 可使遗传性别为雌性个体的表现性别永久的性反转为雄性^[1,2]。虽然雌激素在鸟类性别分化过程起到重要作用, 但鸟类性别过程无疑是

收稿日期: 2006-04-12; 修回日期: 2006-05-09

基金项目: 国家杰出青年科学基金项目(编号: 30225032)资助[Supported by the National Outstanding Youth Science Foundation of China (No. 30225032)]

作者简介: 郑江霞(1980—), 女, 博士研究生, 专业方向: 动物遗传育种与繁殖。E-mail: katie80@sohu.com

通讯作者: 杨宁(1964—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 动物遗传育种。E-mail: nyang@cau.edu.cn

由特定基因来起始并调节的。然而,迄今尚未在鸟类中找到与哺乳动物*SRY*类似的性别决定基因。目前有 3 个较为认可的鸟类性别决定候选基因, *Dsx and mab-3-related transcription factor (DMRTI)*、*Protein kinase C inhibitor (PKCIW)* 和 *Female-specific expression transcription factor (FETI)*。其中 *DMRTI* 位于鸟类的 Z 染色体, 作为雄性性别决定候选基因, 支持鸟类性别决定的 Z 染色体剂量效应假说。*DMRTI* 在进化中高度保守, 鱼类、爬行类、禽类和哺乳动物胚胎的性腺均有表达, 并且在雄性性腺的表达量都高于雌性^[3]。人的 *DMRTI* 位于 9 号染色体短臂, 该位点的缺失会引起 XY 个体性反转^[4]。因此推测, *DMRTI* 基因在鸡性别决定过程中扮演重要角色。另外两个雌性性别决定候选基因, *PKCIW* 和 *FETI* 都位于 W 染色体, 因其雌性特异表达模式被认为可能是鸟类的卵巢决定因子。*PKCIW* 又称为 *ASW (Avian, Sex-specific, W-linked)*, 是被两个研究组同时发现的^[5,6]。*PKCIW* 在 Z 染色体上具有同源基因 *PKCI*, 编码产物为 Hint。*PKCIW* 编码产物是 *PKCI* 的无活性形式。*PKCIW* 可能携带有错误定位或蛋白水解或抑制 Hint 功能的结构域, 并通过与 Hint 形成异二聚体起始鸡的雌性性腺分化过程^[6]。*FETI* 则是 2002 年才克隆得到的 W 染色体特异基因^[7]。*FETI* 位于 W 染色体 *PKCIW* 的串联重复序列中, 在性别决定期 (E4.5 ~ E6.5) 在雌性鸡胚的性腺组织中特异表达, *FETI* 在时间和空间上的表达和其在 W 染色体上的定位说明其在卵巢发育过程中可能扮演重要角色。

目前 3 个性别决定候选基因的功能亟待得到验证。但是由于鸟类本身卵生的繁殖方式使传统转基因实验难于进行。研究人员曾试图通过鸡的异倍体研究寻找线索, Thorne 等^[8]研究发现 ZZZ 三倍体出雏为公鸡, ZZW 为母鸡, 而 ZZW 在性成熟之后性腺及第二性征逐渐发育为雄性。这说明 W 染色体是有雌性化作用, 但是它的作用会逐渐被 Z 染色体的剂量效应所抵消^[9]。但对三倍体鸡群的研究也仅停留在现有水平而未见深入。与此同时, 人工诱导产生的由雌变雄的性反转鸡胚则开始被应用于鸟类性别决定和分化的研究。Smith 等^[10]2003 年检测了性反转鸡胚中 *DMRTI* 基因的表达变化。2005 年, Hudson 等^[11]也接着报道了 *cFOXL2 (chicken forkhead transcription factor 2)* 在性反转鸡胚中的表达。而针对 *FETI* 和 *PKCIW* 在性反转鸡胚表达的研究迄今未见报道。本实验以非甾体类芳香化酶抑制剂 *Fadrozole* 诱导产

生的由雌变雄的性反转鸡胚为实验材料, 系统检测了性别决定候选基因 *DMRTI*、*PKCIW* 和 *FETI* 在性反转和正常鸡胚的表达时间、表达趋势, 表达量差异等。这将有助于进一步了解鸟类性别决定过程。

1 材料和方法

1.1 鸡胚注射和样品采集

实验组在孵化 3.5 天鸡胚气室端注入一种非甾体类芳香化酶抑制剂 (由瑞士诺华公司提供), *Fadrozole* (10 mg/ml) 0.1 mL, 对照组于同时期、同位置注入同体积的 PBS, 石蜡封口后继续孵化。此后 E4.5d (HH29/30 期)、6.5 天 (HH32 期)、8.5 天 (HH34/35 期) 和 10.5 天 (HH36 期) 各采集 15 个实验组和对照组活鸡胚的两侧性腺组织液氮保存, 前后共计取样 120 个 (实验 60 个 + 对照 60 个)。同时保留体组织提取 DNA, 进行性别鉴别。从液氮保存的性腺组织中提取 RNA, 反转录为 cDNA 后, 从每个时间点的实验组和对照组中选取公母各选 5 份样品, 进行实时荧光定量分析, 对 3 个性别决定候选基因 *DMRTI*、*PKCIW* 和 *FETI* 的表达进行检测。

1.2 PCR 鉴定胚胎性别

每只鸡翅下静脉采血 2 mL, ACD 抗凝。酚仿法提取 DNA, -20 保存备用。

根据鸡 *CHDI* 基因内含子序列设计性别鉴别引物, 参照文献^[12], 其序列见表 1, 本实验中的引物均由北京奥科公司合成。PCR 反应体系 (20 μ L) 包括 20 ng 的基因组 DNA, 10 pmol/L 的引物, 1 \times buffer, 2.5 μ mol/L $MgCl_2$, 0.2 μ mol/L dNTPs, *Taq* DNA 聚合酶 1U。PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}C$ 30 s, 55 $^{\circ}C$ 30 s, 72 $^{\circ}C$ 30 s, 一共 30 个循环, 之后 72 $^{\circ}C$ 10 min, 4 $^{\circ}C$ 保温。PCR 产物使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 分别在 *CHD1W* 和 *CHD1Z* 上扩出 400 bp 和 500 bp 左右的片段, 电泳检测母鸡 (ZW) 有两条扩增带, 而公鸡 (ZZ) 仅有一条 500 bp 左右的条带。

1.3 RNA 提取和 cDNA 合成

使用 *TRIzol* (Invitrogen) 一步法提取鸡胚性腺组织的总 RNA 后, 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计 (260 nm) 检测 RNA 质量和浓度。取 2 μ g 总 RNA 进行反转录, 反应过程: 1 \times buffer (10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, 50 mmol/L KCl, 5 mmol/L $MgCl_2$) 0.5 mmol/L dNTPs, 2.5 mmol/L oligo d(T)₁₈, DEPC 水

表 1 引物序列和 PCR 反应条件

Table 1 Primer sequences and conditions used for quantitative RT-PCR amplification

基因名称 Gene	接收号 AC	引物序列 (5'→3') Sequence of primers (5'→3')	复性温度 () Annealing temperature ()	PCR 产物 (bp) PCR products (bp)
<i>PKCIW</i>	AB026677	F: CCATGATATTTACCGCAAGCT R: AAGAAGAGGTGCGCCACAAT	65	101
<i>FET-1</i>	AY113681	F: TTACCTGTGTGATGATCAAGTGCTT R: GCCTTAGATCATGTCTCTCCATGT	63	75
<i>DMRT1</i>	AF123456	F: TGTCTGTAACGTAACCATCAGAACA R: CAGCTGAACAGTCTTCCACTATCC	61	114
<i>GAPDH</i>	AF047874	F: CTTTCCGTGTGCCAACCC R: CATCAGCAGCAGCCTTCACTAC	66	105
<i>CHD</i>	AF004397	F: GTTACTGATTCGTCTACGAGA R: ATTGAAATGATCCAGTGCTTG	55	400/500

适量混匀; 68 变性 5 min, 取出后立即置于冰上, 冷却数分钟后离心, 于冰上加入 2 U/mL RNase-inhibitor 和 2.5 U/mL M-MLV 反转录酶(Promega); 37 温育 1h 后 95 10 min 灭活反转录酶。反应体积 20 μ L。

以 PRIMER EXPRESS 2 跨内含子设计的 *GAPDH* 引物对 RNA 质量和反转录效果进行检测, 其序列见表 1。该引物对 cDNA 扩增片段为 105 bp, 而基因组 DNA 扩增片段为 328 bp。倘若 RNA 样品被基因组 DNA 污染, 则扩增出 105 bp 和 328 bp 2 个片段。

1.4 实时荧光定量 PCR

使用 SYBR Green 1 Mastermix (ABI)对基因表达进行实时荧光定量分析。PRIMER EXPRESS 2 软件跨内含子设计 *DMRT1*、*PKCIW* 和 *FET1* 的引物, 其序列见表 1。引物设计好后首先在普通 PCR 仪 (PTC-100, MJ)上优化反应条件, 如, 适宜的引物浓度和退火温度等, 各基因的 PCR 扩增产物需测序验证。将 *GAPDH* 克隆于 pMD18-T 载体上, 抽提质粒后定量, 作为标准品。

实时荧光定量在 ABI Prism 7900 荧光定量 PCR 仪上进行, PCR 反应体系为 15 μ L, 包括 2 \times SYBR Green qPCR mix 7.5 μ L, 10 μ mol/L 正反向引物各 0.5 μ L, cDNA 模板 1 μ L, 灭菌超纯水 5.5 μ L。引物序列和反应条件见表 1。反应设立 *GAPDH* 为内对照基因, 每个样本进行候选基因和 *GAPDH* 基因扩增时均做 3 个重复。设置阴性对照和水空白对照保证反应的精确度。候选基因与 *GAPDH* 基因的起始拷贝数之比, 作为该基因的相对表达量用于分析。

1.5 统计分析

实验结果采用单因素方差分析, 对实验组、对

照组雌雄鸡胚性腺基因的表达水平进行邓肯氏多重比较(SAS 8.0, SAS Institute Inc., 1999)。实验所得结果表示为均值 \pm 标准差。显著性水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 *GAPDH* 检测 RNA 质量的结果

以反转录后 cDNA 和基因组 DNA 为模板, 用 *GAPDH* 引物进行扩增, 可得到大小不同的两个片段。泳道 1 中 cDNA 的扩增产物为 105 bp, 而泳道 2 中基因组 DNA 的扩增产物则为 328 bp(图 1)。cDNA 为模板的扩增产物中未见 328 bp 片段, 因此所提取的 RNA 质量符合实时荧光定量 PCR 要求。

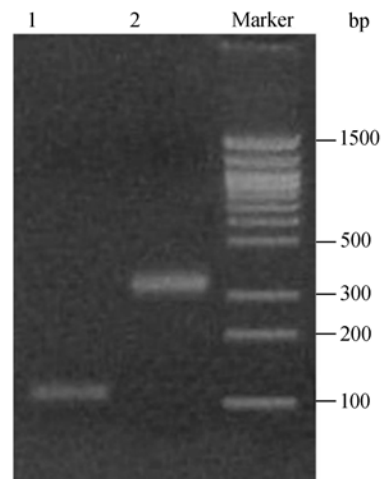


图 1 *GAPDH* 引物对 cDNA 和基因组 DNA 的扩增
1: cDNA; 2: Genomic DNA; Marker: 100 bp DNA ladder。

Fig. 1 PCR amplification of cDNA, genomic DNA with *GAPDH* primers

1: cDNA; 2: Genomic DNA; Marker: 100 bp DNA ladder.

常规荧光定量 PCR 实验反转录前通常使用 DNA 酶 去除 RNA 中污染的基因组 DNA, 但这一

步骤容易造成部分 RNA 的降解。当总 RNA 量少, 样品比较珍贵时, 是否进行这一步处理就显得尤为重要。而事实上如果操作适当, 总 RNA 中基因组 DNA 的污染是可以避免的, 因此需要一个简便的方法来验证 RNA 是否被 DNA 污染。本实验中采用 *GAPDH* 引物扩增方法检测所提 RNA 的质量, 然后决定是否进行 DNA 酶 处理, 提高了实验的有效性。

2.2 鸟类别性别决定候选基因的表达

DMRT1 在雌、雄鸡胚中都有表达, 从孵化 4.5 天开始表达逐渐上升, 雄性个体的表达量始终高于雌性(图 2:A)。性反转 ZW 鸡胚的 *DMRT1* 表达量大幅上升, 达到对照组雄性表达水平的 1/2。而对照雌性个体的 *DMRT1* 表达量始终很低。

PKCIW 在雌性鸡胚中特异表达, 从孵化第 4.5 天检测到表达信号, 6.5 天达表达高峰, 之后逐渐下

降(图 2:B)。在本实验检测的 4 个时间点中, 除孵化 6.5 天外, *Fadrozole* 处理组的表达量显著高于对照组雌性个体。

FET1 在雄性鸡胚中未检测到表达信号, 而在雌性鸡胚性腺中特异表达, 于胚胎孵化的第 4.5 天就可检测到强表达信号, 之后随着胚龄的增加而逐渐下降(图 2:C)。*FET1* 在 *Fadrozole* 处理组和对照组雌性之间表达差异不显著($P < 0.05$)。

3 讨论

利用非甾体类芳香化酶抑制剂 *Fadrozole* 抑制鸡胚体内芳香化酶的活性, 成功诱导遗传性别为雌性的个体表现性别发生性反转已经在大量的研究中得到证实^[1,2,13,14]。*Fadrozole* 抑制雌激素合成, 诱导 ZW 个体的雄性化发育, 影响性别决定和分化相关

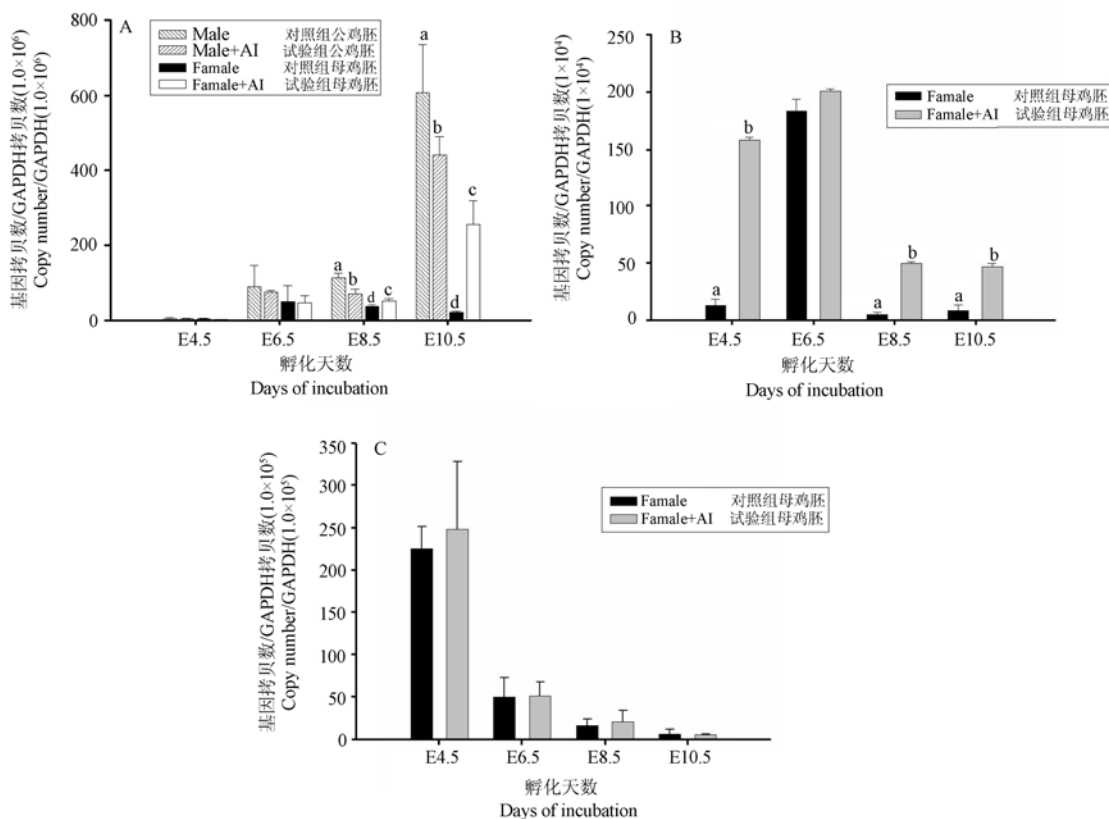


图 2 实时荧光定量检测性别决定候选基因 *DMRT1* (A)、*PKCIW* (B) 和 *FET1* (C) mRNA 在实验组、对照组母鸡胚中的表达

每一时期实验组、对照组母鸡胚各取样 5 只。基因拷贝数与 *GAPDH* 拷贝数之比代表基因的相对表达量, 数值以均值±标准差表示。a,b,c,d: 同一时间点不同字母上标代表差异显著($P < 0.05$)。

Fig. 2 Quantitative RT-PCR of mRNA expression for *DMRT1* (A), *PKCIW* (B) and *FET1* (C) in the gonads of AI-treated and control chicken embryos at E4.5 to E10.5 of incubation.

The expression levels were normalized to that of *GAPDH*. Each data point represents the mean ± SEM of 5 individual chicken gonad samples. Data with non-common superscripts differ significantly at the same day of incubation ($P < 0.05$).

基因的表达。因此本实验利用 Fadzole 这一特殊作用, 诱导出 ZW 型性反转公鸡, 通过检测基因表达的变化趋势和变化幅度对鸟类性别决定候选基因的研究。

本实验所得数据说明鸡 *DMRT1* 可能通过剂量效作用于鸟类的雄性性别决定。*DMRT1* 在性腺分化之前(E4.5)就开始表达, 在所有的检测时间点中, *DMRT1* 在雄性个体中的表达量始终高于雌性, 并在性反转ZW个体中表达上调(图 2:A)。ZZ鸡胚*DMRT1* 高表达可能触发了雄性发育, 但性反转ZW个体 *DMRT1* 表达的上升也导致了雄性化发育, 即便它只含有一条Z染色体。Sinclair等^[10]认为正常鸡性腺精索的形成与*DMRT1* 的表达是相关的, 而睾丸的形态发生开始并依赖于精索和支持细胞的分化。因此, *DMRT1* 上调表达可能诱导了睾丸的形成。实验结果还发现正常ZW个体 *DMRT1* 表达量始终很低, 这可能与芳香化酶的作用有关。因为正常芳香化酶 6.5 天时开始表达^[15], 而在此之前*DMRT1* 在对照组和 AI处理组雌性胚胎的表达量是相近的, 6.5 天之后实验组芳香化酶被抑制, *DMRT1* 的表达开始上升, 这说明芳香化酶在正常雌性中可能直接或间接抑制或下调*DMRT1* 的表达, 因此个体向雌性化方向发育。

*PKCIW*在本实验中为雌性鸡胚中特异表达, 从孵化第 4.5 检测到表达信号, 6.5 天到达表达高峰, 之后逐渐下降。值得注意的是, 在检测的四个时间点(性别决定与分化关键时期)中, Fadzole 处理组 *PKCIW* 的表达量始终高于对照组(图 2:B)。这可能是在 Fadzole 处理后, 伴随 Z 染色体上某些基因, 如 *DMRT1*, *ZPKCI* 等表达上升, 正常剂量的 *PKCIW* 已经无法起始个体的雌性化发育而代偿性的出现表达上升。因为 *PKCIW* 是唯一与其 Z 染色体同源物 *PKCIZ* 在氨基酸水平上有较大差别的基因^[16], 正常情况下认为 *PKCIW* 的作用方式是通过与 *PKCIZ* 的编码产物 Hint 形成异二聚物从而阻断 Hint 的正常功能, 起始个体向雌性方向发育^[6,17]。但在本实验中 *PKCIW* 表达即便出现代偿性的上升, 却未能阻止 ZW 个体的雄性化发育。此外, 三倍体的研究也证实 *PKCIW* 在鸟类的性别决定过程中并不处于主导地位^[18]。此外前人研究结果也并不支持 *PKCIW* 作为鸟类的性别决定候选基因。首先它的表达并不仅限于雌性胚胎的性腺, 它在其它器官也有表达^[5]。其次 *PKCIW* 在平胸鸟类中没有同源基因^[6]。因此, 本研究认为 *PKCIW* 与性别决定有关, 但可能不是主要因子, 它可能直接

或间接与 *DMRT1* 发生互作, 而不可能是鸟类雌性性别决定基因。

FET1 在雌性鸡胚性腺特异表达, 并胚胎孵化的第 4.5 天就可检测到强表达信号, 之后随着胚龄的增加而逐渐下降, 但在 Fadzole 处理组和对照组雌性鸡胚性腺中的表达差异不显著 $P < 0.05$ (图 2:C)。*FET1* 是 Reed 等 2002 年在研究鸟类性腺中基因的差异表达后发现了另外一个鸟类性别决定的候选基因^[2]。*FET1* 与 *DMRT1* 和 *PKCIW* 不同, 哺乳动物中并不存在 *FET1* 的同源基因, 它很可能是进化过程中鸟类或爬行类动物所特有的。本研究中 ZW 个体的雄性化发育并没有影响 *FET1* 的表达, 因此本实验结果难以确定 *FET1* 在性别决定过程中的作用, 还需要进一步的实验进行分析。

综上所述, 鸟类的性别决定是一个复杂的过程。以 ZW 性反转鸡为特殊研究材料的实验表明, *DMRT1* 可能是鸟类的性别决定基因, 它通过剂量效作用于鸟类的雄性性别决定; *PKCIW* 与鸟类性别决定相关, 但它可能直接或间接与 *DMRT1* 发生互作, 而不是鸟类的雌性性别决定基因。

参考文献(References):

- [1] Elbrecht A, Smith RG. Aromatase enzyme activity and sex determination in chickens. *Science*, 1992, 255(5043): 467–470. [\[DOI\]](#)
- [2] Vaillant S, Dorizzi M, Pieau C, Richard-Mercier N. Sex reversal and aromatase in chicken. *J Exp Zool*, 2001, 290(7): 727–740. [\[DOI\]](#)
- [3] Raymond CS, Kettlewell JR, Hirsch B, Bardwell VJ, Zarkower D. Expression of *Dmrt1* in the genital ridge of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development. *Dev Biol*, 1999, 215(2): 208–220. [\[DOI\]](#)
- [4] Bennett CP, Docherty Z, Robb SA, Ramani P, Hawkins J R, Grant D. Deletion 9p and sex reversal. *J Med Genet*, 1993, 30(6): 518–520.
- [5] O'Neill M, Binder M, Smith C, Andrews J, Reed K, Smith M, Millar C, Lambert D, Sinclair A. ASW: a gene with conserved avian W-linkage and female specific expression in chick embryonic gonad. *Dev Genes Evol*, 2000, 210(5): 243–249. [\[DOI\]](#)
- [6] Hori T, Asakawa S, Itoh Y, Shimizu N, Mizuno S. *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. *Mol Biol Cell*, 2000, 11(10): 3645–3660.

- [7] Reed KJ, Sinclair AH. FET-1: a novel W-linked, female specific gene up-regulated in the embryonic chicken ovary. *Mech Dev*, 2002, 119 Suppl 1: S87-90. [\[DOI\]](#)
- [8] Thorne MH Sheldon BL. Triploid intersex and chimeric chickens: useful models for studies of avian sex determination. In: Sex Chromosomes and Sex Determining Genes. Reed KC and Graves JAM Editors. Harwood Academic Publishers: Switzerland, 1993, 201—208.
- [9] Ellegren H. Dosage compensation: do birds do it as well? *Trends Genet*, 2002, 18(1): 25—28. [\[DOI\]](#)
- [10] Smith C, Katz M Sinclair AH. DMRT1 is upregulated in the gonads during female-to-male sex reversal in ZW chicken embryos. *Biol Reprod*, 2003, 68(2): 560—570. [\[DOI\]](#)
- [11] Hudson QJ, Smith CA, Sinclair AH. Aromatase inhibition reduces expression of FOXL2 in the embryonic chicken ovary. *Dev Dyn*, 2005, 233(3): 1052—1055. [\[DOI\]](#)
- [12] HU Rui-Ying, GENG Xin, MA Jun, CHEN Yun-Shuang, LI Zhong-Kui, DING Xiao-Yan. A simple and universal method for molecular sexing of birds. *J Exp Bio*, 2003, 36(5): 401—404.
胡锐颖, 耿昕, 马珺, 陈云霜, 李仲逵, 丁小燕. 一种简单通用的鸟类性别分子鉴定技术. *实验生物学报*, 2003, 36(5): 401—404.
- [13] Abinawanto, Zhang C, Saito N, Matsuda Y, Shimada K. Identification of sperm-bearing female-specific chromosome in the sex-reversed chicken. *J Exp Zool*, 1998, 280(1): 65—72. [\[DOI\]](#)
- [14] Vaillant S, Guemene D, Dorizzi M, Pieau C, Richard-Mercier N, Brillard JP. Degree of sex reversal as related to plasma steroid levels in genetic female chickens (*Gallus domesticus*) treated with Fadrozole. *Mol Reprod Dev*, 2003, 65(4): 420—428. [\[DOI\]](#)
- [15] Yoshida K, Shimada K, Saito N. Expression of P450 (17- α) hydroxylase and P450 aromatase genes in the chicken gonad before and after sexual differentiation. *Gen Comp Endocrinol*, 1996, 102(2): 233—240. [\[DOI\]](#)
- [16] HU Rui-Ying, LI Zhong-Kui, DING Xiao-Yan. Progress in the investigation of avian sex determination and sex identification. *Hereditas*(Beijing), 2005, 27(2): 297—301.
胡锐颖, 李仲逵, 丁小燕. 鸟类性别决定机制及性别鉴定的研究进展. *遗传*, 2005, 27(2): 297—301.
- [17] Moriyama S, Ogihara J, Kato J, Hori T, Mizuno S. PKCI-W Forms a heterodimer with PKCI-Z and inhibits the biological activities of PKCI-Z *in vitro*, supporting the predicted role of PKCI-W in sex determination in birds. *J Biochem* (Tokyo), 2006, 139(1): 91—97. [\[DOI\]](#)
- [18] Graves JA. Sex and death in birds: a model of dosage compensation that predicts lethality of sex chromosome aneuploids. *Cytogenet Genome Res*, 2003, 101(3-4): 278—282. [\[DOI\]](#)