

文章编号: 1004-7271(2009)01-0094-07

· 综述 ·

鱼类性别决定及其研究方法进展

姚延丹^{1, 2}, 龙 华¹, 陈建武¹, 付元帅^{1, 2}, 陶 玲¹, 李 谷¹

(1 中国水产科学研究院长江水产研究所, 农业部淡水鱼类种质资源与
生物技术重点开放实验室, 湖北 荆州 434000;
2 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘 要:近二十年, 有关鱼类性别决定的研究取得了很大进展, 主要集中在温度、激素以及性别连锁基因、BKM、ZFY、芳香化酶基因、H-Y 抗原、Sox、SRY、DMRT¹、DMY、DAX-1、核受体基因家族、SF-1 和 WT-1 等性别决定基因对性别分化的调控方面, 杂交和分子标记技术则提供了有效的技术手段。这些研究为进一步阐明鱼类决定机制提供了基础和手段, 但仍存在一些问题有待探索。阐述了近些年有关鱼类性别决定因子及其研究方法方面的研究动态和进展, 并对鱼类性别决定的研究前景、存在的问题和发展的趋势做了简述, 以期对系统研究鱼类性别决定机制提供参考。

关键词: 鱼类; 性别决定; 研究方法; 进展

中图分类号: S 917 文献标识码: A

The progress in fish sex-determination and its research methods

YAO Yan-dan^{1, 2}, LONG Hua¹, CHEN Jian-wu¹, FU Yuan-shuai^{1, 2}, TAO Ling¹, LI Gu¹

(1 Key Laboratory of Freshwater Fish Germplasm Resources & Biotechnology Yangtze River
Fisheries Research Institute Chinese Academy of Fisheries Sciences Jingzhou 434000, China;
2 College of Fisheries and Life Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: In the past few decades significant advances have been made in research of fish sex determination, mainly centered in the aspects of sex differentiation regulation such as temperature hormone and the sex related genes (sex-linked gene BKM, ZFY, aromatases gene H-Y antigen Sox, SRY, DMRT¹, DMY, DAX-1, Ftz-F1 gene, SF-1 and WT-1), and hybridization and molecular sex-specific markers provide valid technique means. These findings lay a foundation for further studies on the function and regulation of sex genes aiming at elucidation of the mechanism of determination and provide potential tool for fish sex determination, but there are still some questions that needed further research. In this mini-review, progress in the past few decades on sex related genes and research method of fish were summarized. Prospects significance and possible future directions of the studies on fish sex determination were also discussed. Through this paper systematic research on mechanism of fish sex determination is expected to provide

Key words: fish; sex determination; research method; progress

收稿日期: 2008-09-05

基金项目: 池塘优质高效养殖技术研究与示范 (2006BAD03B01)

作者简介: 姚延丹 (1984-), 女, 硕士研究生, 专业方向为微生物分子生态学。E-mail: fairy3558@yahoo.com.cn

通讯作者: 李 谷, E-mail: Ligu667@yahoo.com.cn

全世界现存鱼类约 24 000 余种,分属 57 个目 482 个科 4 256 个属,约占脊椎动物的一半,涵盖广泛的性别决定与分化方式^[1]。与高等脊椎动物相比,鱼类性别决定的基础仍是遗传基因,不同的是在许多鱼类中,决定性别的基因并不明显地集中于性染色体上,常染色体上的基因更多地参与到性别决定中。另外,在发育的早期,某些外部、内部因素,如水温、光照以及激素、代谢物等都可能通过某种途径改变机体的新陈代谢,特别是改变与性别决定有关的某些生理生化过程,从而影响鱼类的性别分化,使鱼类性别决定机制益显复杂化。迄今为止,人们提出了多种识别鱼类性别决定体系和性染色体的方法。直到 20 世纪 90 年代,随着分子生物学技术的发展及人类雄性决定基因位点的确定和克隆,鱼类性别决定基因的研究才全面展开,而广泛地研究尚处于进化早期阶段的鱼类的性染色体及性别决定机制,将有可能勾划出脊椎动物性染色体的演化历程。同时,对于水产养殖来说,通过人为控制性别的方法专门生产全雌或全雄鱼苗进行单性养殖,可以显著提高经济效益,因此具有重要的实用价值。下面就一些常见的鱼类性别决定因子及其研究方法做一简单综述。

1 鱼类性别决定和性染色体

高等脊椎动物的性别决定系统一般较为简单,如哺乳动物的 XX/X_Y,鸟类的 ZW/Z_Z等。细胞遗传学研究表明,鱼类的性别决定几乎包括了动物的所有性染色体类型。把目前积累的关于鱼类性别决定的资料与高等脊椎动物类群相比较,可以得出如下结论:鱼类的性染色体和性别决定体系并非整齐划一,而是存在着多种形式。目前一般认为鱼类的性染色体决定类型主要有 5 类^[2]: (1) XX/X_Y型,为大多数鱼类的性染色体类型,如刺鳅 (*Mastacembelus aculeatus*)等; (2) ZW/Z_Z型,如大鳞副泥鳅 (*Parasilgumus dabryanus*)等,在数目上 ZW/Z_Z型少于 XX/X_Y型,据估计,XX/X_Y与 ZW/Z_Z型占到鱼类种类的 70%左右; (3) ZO/Z_Z与 XX/X_O型,前者为雌性配子异型,如短颌鲚 (*Coilia brachygnathus*); 后者为雄性配子异配型,如摺胸鱼 (*Stemoptyx diaphana*); (4) X₁X₁X₂X₂/X₁X₂Y型,仅发现于鱼类,如触角副鲷 (*Parablennius tentacularis*); (5) 常染色体型,即用现有技术手段未能发现任何异型性染色体,性别可能主要由常染色体决定,如斑马鱼 (*Brachydanio rerio*)。少数鱼类具有复杂的性别决定系统,如剑尾鱼 (*Xiphophorus spp.*)的 WXY,以及某些罗非鱼 (*Oreochromis spp.*)的 AA(aa)W_XY。

鱼类性染色体的出现与否及性染色体的种类与其系统进化地位无关。鱼类性染色体的分化发生于进化历程不同的分类群中,目前尚未有发现某一较大分类群都具有相同的性染色体决定体系的报道。

2 性别决定基因

目前在鱼类性别决定与分化中起关键作用的基因或染色体区域还知之甚少,研究过程也经历了从鱼类基因组中寻找哺乳动物性别基因的同源基因,逐渐转向寻找鱼类自身的性别决定基因。鱼类性染色体上有关性别决定的基因数量仍然未知,虽然通常性染色体是上位性的,但有时位于常染色体上的基因的作用可能超过它们,而且在不同种类,染色体决定在性别决定中的相对作用强度是不同的。近年来研究比较多的几类性别决定基因如下:

2.1 性别连锁基因 (Sex-linked gene)

Matsuda等^[3]分离到了青鳉 (*Oryzias latipes*)的性别连锁基因 SL1 和 SL2 并用 Southern 印迹证明 SL2 为重复序列且是双臂染色体群的共同祖先得到扩增所致。Sakamoto等^[4]绘制了虹鳟微卫星连锁图谱,得出雌雄鱼端区染色体重组率有差异。Almeida Toledo等^[5]用 C 带技术分析了 *Gymnotiforms* (1 种电鳗)雄鱼 Y 染色体中心粒区和雌性相应端区,发现 Y 染色体上存在少量 G + C 丰富带,且认为此现象可能在鱼类性别基因分化中较广泛出现。

2.2 重复序列 (Banded Krait Minor BKM)

重复序列是基因进化的源泉之一,在性别染色体的分化进化中可能起着一定的作用。BKM 微卫星序列 (GATA)在鸟类和爬行类性别决定中有一定作用,也是性染色体的标志之一。鱼类中发现有此类

重复序列的同源片段,但还没有证据显示它们具有性别决定作用^[6]。Nanada等^[7]用合成的特异简单重复序列作探针对无性异染色体的鲮科(Poeciliidae)某些种进行杂交分析,结果出现了性别特异的杂交图谱,结合C带技术证明网纹鲮(*Poecilia reticulata*)雄性为异型染色体,但黑花鲮(*Poecilia sphenops*)雌性为异型染色体,他们认为性染色体是通过性别特异的组织重复序列分化来的。总之,重复序列在性染色体异型化进化中可能起一定的作用,但其是否一定构成性别决定基因还有待研究。

2.3 SRY(Sex related Region of Y)基因

SRY基因是哺乳动物性别决定过程中睾丸决定因子的主宰基因,位于Y染色体上。周荣家等^[8]利用Southern印迹杂交的方法,证明胡子鲇和斑马鱼基因组DNA均能与人的SRY探针结合,表明这两种鱼都存在SRY基因的同源序列,但是却没有发现与性别有关的特异杂交带,即无性别特异性。泥鳅、刺鳅、鲫和白缘鳅中也得到有关SRY基因同源性的类似实验结果。人的SRY同源基因还被定位在黄鳝(*Monopterus albus*)的第1号染色体上^[9]。总的来看,SRY等因子不是鱼类性别决定的因子。但是,它是否可能像哺乳动物那样对性别决定的下游基因(例如Sox⁹基因)有调控作用,目前还没有证据。

2.4 锌指结构基因(ZFY)

近年来的研究表明,Y染色体上的锌指结构基因(zinc-finger Y gene ZFY)是继SRY之后又一个与性分化有关的单拷贝基因,并与精子的发生有关^[10]。这个基因所编码的蛋白质在结构上是由氨基酸构成的许多指状环组成,中间由锌桥连接,因此称之为“锌指”蛋白。这种蛋白质具有明显的可与DNA结合的结构特征,因而可能参与基因表达调节。以ZFY片段为探针,在珊瑚鱼(*Anthias squamipinnis*)、斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)、虹鳟中不能产生性别特异性的杂交带。现在认为它不是性别决定的主要信号,而是可能在性别分化的级联作用中担任某一角色或是作为一般的转录因子。

2.5 芳香化酶基因(Aromatases gene)

芳香化酶是类固醇激素代谢中的1种重要酶类,属于细胞色素P450家族的一员,广泛存在于大多数脊椎动物的脑和垂体中,可催化某些雄激素转化为雌激素,是雌激素生物合成中的关键酶和限速酶,而性激素在鱼类性别分化中是必需的。研究表明,鱼类脑和垂体中的芳香化酶水平比其他脊椎动物高出100~1000倍^[11],该基因的表达可能参与了鱼类性腺分化的调节。在虹鳟和罗非鱼(*Tilapia nilotica*)的性分化期,芳香化酶在所有XX性腺呈高水平表达,而在XY性腺表达却很低^[12]。Kitano等^[13]发现,用芳香化酶抑制剂阻断虹鳟、罗非鱼雌激素的生物合成,将诱导功能性精巢的产生。从现有的资料来看,芳香化酶在脊椎动物雄性个体生殖中的作用还不太清楚,其调节机理较为复杂,目前只知道与性激素含量的变化有关,与其他因素的关系如何,还需要进一步探讨。

2.6 H-Y抗原(H-Y antigen)

H-Y抗原是细胞表面的1种大分子,在脊椎动物中,不但与性别的异配性始终有关,而且还具有进化上的保守性,即H-Y抗原性(+)是异配性别。对鱼类研究发现,较低等的鱼类如等椎类的鲑科鱼类及骨鳔类的鲤科鱼类,H-Y抗原在雌雄鱼都有表达,说明H-Y抗原系统的表达可能在进化过程中逐步分化。现已知北极红点鲑(*Salvelinus alpinus*)、虹鳟、拟鲤(*Rutilus rutilus*)、鲫的雌雄鱼性腺细胞都有H-Y抗原,并且抗原、抗体反应程度相似,但在较高等的鱼类显示异型染色体性别具有H-Y抗原,如青鲮、罗非鱼等雄性有H-Y抗原,雌性则无^[14],H-Y抗原已与性别相关联。现有的研究成果表明,当H-Y抗原与性别相关时,它一定与异配性别的性腺分化有关。

2.7 Sox基因家族

Sox基因在哺乳类性别决定中起着较重要的作用,目前在许多种类中都已开展了Sox基因的研究。如黄鳝的Sox⁹被定位于6号染色体,Sox¹⁷定位于5号染色体^[15]。姚波等^[16]利用石斑鱼(*Epinephelus*)揭示了Sox³是否持续表达,将决定配子发生向两种截然不同的方向进行。这一发现证实了Sox³在卵子发生和配子细胞分化中的潜在调控作用,并确信Sox³在卵子发生中的作用比在精子发

生中的作用大得多。另外,研究者在鱼类基因组中发现 Sox基因家族中的一些基因具有两个不同序列拷贝的现象,如黄鳝有 Sox^{9a}和 Sox^{9b}基因,虹鳟也具有两个不同的 Sox⁹基因。推断这种重复可能出现在硬骨鱼进化过程中的相对早期,也许与硬骨鱼整个基因组的复制有关,这种复制使一些功能基因也产生了重复,但也不能排除一些重复序列是假基因的可能性^[17]。目前的研究显示, Sox基因家族广泛存在于鱼类中,其结构和功能有一定的保守性,与发育过程密切相关,但没有发现该家族的基因是性别决定基因。

2.8 DMY(DM domain gene on Y-chromosome)基因

作为研究性别决定基因及其功能的后选基因,最终还是必须从鱼类本身的基因组中去定位和寻找性别相关的基因或 DNA 标记。在这方面的研究中,以青鳉得到的结果最令人鼓舞。从青鳉 Y 染色体上找到的 DMY(Double Sex / mab-3 domain of Y chromosome)^[18]是迄今鱼类在 Y 染色体上找到的、与精巢发生和分化直接相关证据最充分的 1 个性别决定功能基因,与 SRY 在哺乳类的作用类似。DMY 仅在青鳉 Y 性腺体细胞内表达,是雄性正常发育所必需的,且其表达量需达到一定的阈值,减少也将产生 XY 雌性个体;其开放阅读框 1 个点突变也能诱导 XY 雌性个体产生。但 DMY 并不存在于青鳉的所有种系,也未能在其他硬骨鱼类中找到其同源基因。所以鱼类性别决定是有别于哺乳类的,在不同的种甚至是不同的品系之中,可能存在不同的性别决定基因。

2.9 DMRT 1(DM-related transcription factor)基因

Raymond 等^[19]在人类中克隆到 DMRT1 基因后,根据表达谱和染色体定位,认为该基因是 1 个性别分化基因,与雄性性别发育有关。在鱼类方面,目前已从罗非鱼、虹鳟、青鳉等中克隆了 DMRT1 基因^[20-22]。在罗非鱼中,组织特异性表达检测表明 DMRT1 基因只在精巢中表达;雄激素诱导产生的 XX 雄鱼的精巢中有 DMRT1 基因的表达。在虹鳟中,DMRT1 也只在精巢中表达;性腺分化发育期,DMRT1 基因在精巢中表达,卵巢中则无。在青鳉中,性别决定期的性腺中未检测到 DMRT1 的表达;在成体组织中,DMRT1 也只在精巢中表达。上述结果表明,与在其它脊椎动物中的功能一样,在鱼类中,DMRT1 是 1 个性别分化基因,与精巢的形成和功能维持有关。

除了上述几种基因,位于 X 染色体剂量敏感性反转决定区上的候选基因 DAX-1 基因;在哺乳类性别决定、分化及肾上腺-性腺轴中起重要作用的核受体家族中的孤独受体;调控尿殖管发育,在胚胎发育早期尿殖管道的发育中起重要作用的 WT-1 基因也得到了广泛的关注。

3 环境因子与性别决定

鱼类性别由基因型决定,但可受外界环境的影响。如温度、pH、盐度、光照、水质、食物丰度和种群内部因素等都能在不同程度上影响鱼类的性别。迄今,温度和外源激素是研究得最多的两个外界因素。

3.1 温度的影响

越来越多的鱼类被证明其性别决定受温度和基因双重调节,研究表明,温度对于热敏感鱼类的性别决定是主要的控制因子,即温度性别决定 (temperature sex determination, TSD)。目前只在近 20 种鱼中发现了 TSD,但野外研究只在月银汉鱼 (*Menidia menidia*) 有报道^[23],已证实月银汉鱼的性别决定是由遗传和环境因子在仔鱼发育的某个阶段共同控制的结果,在比较恶劣的环境(如高温)下发育成雄鱼,而在比较优越的环境(如低温)下发育成雌鱼,这是环境决定性别现象在鱼类中的首例报道^[24]。而在已知为染色体遗传控制性别的鱼类中,温度仍扮演了影响性分化的重要角色。如尼罗罗非鱼为 XX/XY 的性别遗传方式,在性别分化的时候,若略微提高水温会压抑雌激素的分泌而造成雄性化的现象。TSD 的敏感期局限在个体发育的早期阶段,在鱼类,超越敏感期的温度控制不会逆转性腺性分化的方向。值得提出的是,TSD 敏感期也可能短于性腺组织学上的分化期^[25]。

3.2 外源激素的影响

外源激素可以起到性逆转的作用。在硬骨鱼的性逆转实验中,使用甾类激素诱导效果好于非甾类

激素。通过使用甾类激素在性腺性分化的关键时期处理仔、稚鱼,可得到单性或原发单性种群,已获得单性化养殖成功的鱼包括尼罗罗非鱼、莫桑比克罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*)、青鳉等。除少数例子是用雄激素导致雌性化并可将其结果应用于生产外^[26],最典型的是用雄性激素得到雄性个体而用雌性激素得到雌性个体。这给鱼类性别决定研究提供了 1 个启示:在个体发育过程中,甾类激素可能是性分化过程中的 1 个重要因素。在一些种类,通过性逆转可获得高比例的雌鱼,但较难获得高比例的雄鱼,因而一些作者认为,卵巢的分化可能早于精巢^[27]。外源甾类激素也可以用来研究鱼类性别决定的内分泌学机理。不少实验已证实芳化酶参与非哺乳类性腺分化的调控^[28],然而其作用是否是直接的,仍存在争论,性逆转实验有助于对这一问题的理解。

4 鱼类的性染色体标记和性别特异片段鉴别的研究方法

由于大多数鱼类性染色体分化程度较低且性别决定的可塑性大,导致性表现与遗传基础不一致,此特点对单性鱼的生产极其不利。因而发展一种可以识别其遗传组成的简便方法将具有十分重要的意义。应用传统的方法如:性连锁性状、性逆转、染色体带型、种间杂交和人工诱导单性发育等已经开展了大量的工作并取得了一定的成绩^[29]。利用显微操作技术分离单染色体(如 X 染色体或 Y 染色体)来建立单性的染色体基因文库显得相对复杂,而找出特异性的 DNA 片段,作为性别决定遗传基础的分子标记是 1 种较简捷的鉴定方法。用不同的分子标记技术在鱼类中已经找到了一些性别特异的或性别连锁的 DNA 片段,为定位和鉴定性染色体以及鉴定鱼类的遗传性别奠定了基础。分子标记大体可分为基于 Southern 杂交技术的分子标记和基于 PCR 技术的分子标记。前者主要有 RFLP(限制性片段长度多态性)和小卫星 DNA。后者应用于鱼类性别决定遗传基础的主要有:RAPD 标记(随机引物扩增多态性 DNA)、SSR 标记(微卫星 DNA)和 AFLP 标记(扩增片段长度多态性)。综合比较以上几种标记,各有优缺点,虽然兼具 RFLP 可靠性和 RAPD 简便灵敏性的 AFLP 技术被认为是目前一种十分理想、有效的分子标记,可称之为分子标记技术的又一次重大突破,但是此技术诞生时间较短且费用昂贵,对 DNA 的纯度和内切酶的质量要求很高。随着分子生物学技术的进一步发展,DNA 分子标记技术将会更加完善,更有效、更简便、更廉价的分子标记将会不断出现。相信随着这一新型的生物技术的不断完善和开发利用,将会在生物领域得到更广阔的应用,将促使人们对物种遗传基础进行深入研究,势必给人类社会生活的各个方面带来更深刻的变化。

FISH 技术 (fluorescence in situ hybridization) 是细胞学方法与分子杂交技术相结合的产物。此技术在鱼类遗传学的研究与哺乳动物相比,还不够深入、广泛,主要在基因定位、性别鉴定、染色体变异和进化、种间杂交方面进行了研究并取得了一定成绩。尤其是与常规的细胞遗传分析技术相结合,利用 FISH 技术通过对核糖体基因 rDNA 的定位对 NORs(核仁组织者区)的研究,可以说是最活跃的领域之一。但是,有些鱼类 rDNA 的 FISH 定位结果和银染结果相一致,而有些不一致^[30]。据推测,此现象可能与冷血脊椎动物的基因组未区室化有关。并且,在细胞周期中,是不是所有的 rDNA 都有转录活性也存在争议。总的来说,FISH 技术的发展沿着两条路线前进:一方面是采用不同的探针衍生出许多 FISH 新技术,如 Multicolor-FISH、CGH、GISH、CISH、BAC-FISH、Chromosome Painting 以及 Reverse Chromosome Painting 等;另一方面则是努力提高分辨率,将靶目标从中期染色体发展到 DNA 纤维,使其分辨率由 1 Mb 发展到 1 kb 更进一步拓展了 FISH 技术的应用领域,使其成为分子细胞遗传学的 1 项代表技术。

5 展望

目前在一些具有初步或较好异型性染色体分化的鱼类中,已经有了关于性染色体作图的报道^[31]。这些工作为在更多鱼类中寻找和定位性别决定位点(区段),进而克隆和鉴定性别决定基因奠定了初步基础。但是鱼类性别决定的研究还有许多问题有待解决,主要有:(1)由于鱼类性染色体分化程度较低,加之染色体细小而数目众多,凭借目前的细胞遗传学显带技术,开展更多鱼类的性染色体标记和鉴

定还有较大困难;(2)在大多数鱼类中,因为雌雄性别染色体组(基因组)差异小,克隆探针较难,FISH等鉴定方法的成效不明显,性别决定基因还难以直接用物理图谱基础上的大片段克隆方法获得;(3)具有良好性染色体分化的鱼类较少,而且这些种类的研究成果不一定适合于更原始的性别决定类型;(4)性别多基因决定的作用模式不明。

分子生物学技术的迅猛发展为鱼类性别决定研究提供了有效的技术手段,已经成为研究鱼类性别决定的重要方法。随着人类基因组计划和后基因组计划的实施,新的研究思路以及分子细胞生物学和分子遗传学研究方法不断成熟,对鱼类性别决定的分子基础研究将会有很大促进作用。最近,在学术界,对于基因的性别差异表达的研究很活跃(如 *Rs1* 和 *Rs2* 基因^[32]、*Ob* 基因^[33]等),推测其可能与性连锁或性染色体差异有关。其研究成果在进化地位不同的物种间均有报道^[34-35]。该研究不仅对于性别决定机制的研究具有重要理论意义,同时具有重大的应用价值。有些鱼类的生长和生理特性与性别有着很大的关系,如雄性罗非鱼的生长速度就比雌鱼快,雌性鲤、雌性草鱼的生长分别比雄性个体快,抗病性能也有差异,通过养殖单性鱼可以大幅度提高养殖产量。因此需要对鱼类性别决定和分化的机制及性别特异标记进行广泛和深入的研究,这样不仅可以通过性别分化研究来分析动物的生理生化过程的差异,而且可以利用性别差异来提高水产养殖产量和经济效益。

参考文献:

- [1] Devlin R H, Nagahama Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological and environmental influences [J]. *Aquaculture* 2002, 208(3-4): 191-364.
- [2] 童金苟, 朱嘉濠, 关海山. 鱼类性别决定的遗传基础研究概况 [J]. *水产学报*, 2003, 27(2): 169-176.
- [3] Matsuda M, Matsuda C, Hanaguchi S, et al. Identification of the sex chromosomes of the medaka *Oryzias latipes* by fluorescence in situ hybridization [J]. *Cytogenet Cell Genet* 1998, 82(3-4): 262-275.
- [4] Sakamoto T, Danzmann R G, Gharbi K, et al. A microsatellite linkage map of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) characterized by large sex specific differences in recombination rates [J]. *Genetics* 2000, 155(3): 1331-1345.
- [5] Almeida T L F, Foresti F, Daniel M F, et al. Sex chromosome evolution in fish: the formation of the neo-Y chromosome in *Eigenmannia* (*Gymnotiformes*) [J]. *Chromosoma* 2000, 109(3): 197-200.
- [6] Wachtel S, Demas S, Tiersch T, et al. BKM satellite DNA and ZFY in the coral reef fish *Anthias squamipinnis* [J]. *Genome* 1991, 34(3): 612-617.
- [7] Nanada I, Scharl M, Eppel J T, et al. Primitive sex chromosomes in poeciliid fishes harbor simple repetitive DNA sequences [J]. *J Exp Zool* 1993, 265(3): 301-308.
- [8] 周荣家, 余其兴, 程汉华. SRY盒基因在斑马鱼和胡子鲶中的保守性分析 [J]. *遗传*, 1996, 18(1): 1-3.
- [9] 李奎, 余其兴, 赵则春, 等. 二价染色体上黄鳍 SRY盒基因的高分辨区域定位 [J]. *中国水产科学*, 1998, 5(4): 101-103.
- [10] Ao A, Erickson R P, Winston R M, et al. Transcription of paternal Y linked genes in the human zygote as early as the pronuclear stage [J]. *Zygote* 1994, 2(4): 281-287.
- [11] Calland G V, Peter Z, Ryan K J. Estrogen synthesis in vitro and in vivo in the brain of a marine teleost (*Moxocephalus*) [J]. *Gen Comp Endocrinol* 1981, 43(2): 245-255.
- [12] Bamiller J F, D'Cotta H. Environment and sex determination in farmed fish [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 2001, 130(2): 399-409.
- [13] Kitano T, Takamune K, Nagahama Y, et al. Aromatase inhibitors and 17α methyltestosterone cause sex-reversal from genetical female to phenotypic males and suppression of P450 aromatase gene expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *Mol Reprod Dev* 2000, 56(1): 1-5.
- [14] 吴仲庆. 水产生物遗传育种学 [M]. 厦门: 厦门大学出版社, 1991, 152-158.
- [15] 周荣家, 余其兴, 程汉华, 等. PCR扩增黄鳍和刺鲃 SRY盒基因 [J]. *科学通报*, 1996, 47(7): 640-642.
- [16] Yao B, Zhou L, Gui J F, et al. Differential expression and dynamic changes of SOX3 during gametogenesis and sex reversal in protogynous hermaphroditic fish [J]. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* 2007, 4(307A): 207-219.
- [17] 汪锐, 程汉华, 郭一清, 等. 脊椎动物 Sox基因家族的系统发生分析 [J]. *遗传学报*, 2002, 29(11): 990-994.
- [18] Konda M, Nanda I, Hamung U, et al. Absence of the candidate male sex-determining gene *dmrtb* (Y) of medaka from other fish species [J]. *Current Biol* 2003, 13(5): 416-420.
- [19] Raymond C S, Shanu C E, Shen M M, et al. Evidence for evolutionary conservation of sex determining genes [J]. *Nature* 1998, 391

(6668); 691—695.

- [20] Guan G, Kobayashi T, Nagahama Y. Sexually dimorphic expression of two types of DM (Double sex / Mab3) domain genes in a teleost fish—the tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2000, 272(3): 662—666.
- [21] Marchard O, Goreronn M, D' Cotta H, et al. DMRT1 expression during gonadal differentiation and spermatogenesis in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Biochim Biophys Acta* 2000, 1493(1—2): 180—187.
- [22] Brunner B, Hanung U, Shan Z, et al. Genomic organization and expression of the double-sex-related gene cluster in vertebrates and detection of putative regulatory regions for DMRT1 [J]. *Genomics* 2001, 77(3): 8—17.
- [23] Stussmann C A, Patino R. Sex determination: environmental[M] // Knobil E, Neill J D (eds). *Encyclopedia of Reproduction Academic Press* 1999, 4: 402—409.
- [24] Conover D O, Kynard B E. Environmental sex determination: Interaction of temperature and genotype in a fish [J]. *Science* 1981, 213(4507): 577—579.
- [25] Baroiller J F, Chourmut D, Fostier A, et al. Temperature and sex chromosome govern sex ratio of the mouthbrooding cichlid fish *Oreochromis niloticus* [J]. *J Exp Zool* 1995, 273(3): 216—223.
- [26] Patino R. Manipulation of the reproductive system of fishes by means of exogenous chemicals [J]. *The Progressive Fish Culturists* 1997, 59(2): 118—128.
- [27] Takamatsu N, Kanda H, Ito M, et al. Rainbow trout Sox9: cDNA cloning, gene structure and expression [J]. *Gene* 1997, 202(1): 167—170.
- [28] Piferer F, Zanuy S, Carrillo M S, et al. Brief treatment with an aromatase inhibitor during sex differentiation causes chromosomally female salmon to develop as normal functional males [J]. *J Exp Zool* 1994, 270(3): 255—262.
- [29] Yamamoto T, Kajishima T. Sex hormone induction of sex reversal in the gold fish and evidence for male heterogamety [J]. *J Exp Zool* 1968, 168: 215—222.
- [30] Sola L, Cipelli O, Gomung E, et al. Cytogenetic characterization of the greater amberjack *Seriola dumerili* (Pisces: Carangidae), by different staining techniques and fluorescence in situ hybridization [J]. *Mar Biol* 1997, 128(4): 122—124.
- [31] Young W P, Wheeler P A, Coryell V H, et al. A detailed linked map of rainbow trout produced using doubled haploids [J]. *Genetics* 1998, 148(2): 1—13.
- [32] Krebs C J, Larkins L K, Khan S M, et al. Expansion and diversification of KRAB zinc-finger genes within a cluster including Regulator of sex-lin itation 1 and 2 [J]. *Genomics* 2005, 85(6): 752—761.
- [33] 周杰, 赵茹茜, 韦习会, 等. 二花脸和大白猪脂肪 leptin 和下丘脑中 Ob-Rb 基因表达的发育性变化 [J]. *中国科学 (C辑)*, 2003, 33(6): 525—531.
- [34] 俸艳萍, 彭秀丽, 李世军, 等. 应用抑制消减杂交分离雌、雄鸡胚性分化早期的差异表达基因 [J]. *动物学报*, 2007, 53(2): 315—324.
- [35] 李尚伟, 文建军, 庞 岚, 等. 性逆转石斑鱼性腺差异表达基因的克隆和筛选 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2004, 20(2): 189—194.