

综述

## 双壳类的性转换现象及其机理探讨

于非非<sup>1</sup> 余祥勇<sup>1</sup> 王梅芳<sup>1</sup> 周莉<sup>2</sup> 桂建芳<sup>2</sup>

(1. 广东海洋大学水产学院, 湛江 524025;  
2. 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

### SEX REVERSAL PHENOMENA IN BIVALVES AND ITS MECHANISM

YU Fei-Fei<sup>1</sup>, YU Xiang-Yong<sup>1</sup>, WANG Mei-Fang<sup>1</sup>, ZHOU Li<sup>2</sup> and GUI Jian-Fang<sup>2</sup>

(1. Fisheries College, Zhanjiang Ocean University, Zhanjiang 524025; 2. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, the Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

关键词: 双壳类; 性转换; 雌雄同体; 马氏珠母贝

Key words: Bivalves; Sex reversal; Hermaphrodite; *Pinctada martensi*

中图分类号: Q344.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2007)04-0576-05

生物的雌雄同体及性变现象,历来受科研人员关注,在脊椎动物中已有不少研究,在双壳类中虽然也有报道<sup>[1-4]</sup>,但研究尚不深入。有关双壳类群体的性别构成,一般认为多为雌雄异体,如马氏珠母贝、栉江珧、企鹅珍珠贝、巴非蛤等;少数物种为雌雄同体,如海湾扇贝、光滑蓝蛤及某些牡蛎。但在雌雄异体种类的群体中,常常发现雌雄同体的个体以及在一定条件出现的性别转化现象<sup>[4-8]</sup>。本文综述了双壳类的性别转换现象及其机理的研究状况,并结合我们目前在马氏珠母贝开展的工作,介绍相关研究的一些新进展。

### 1 雌雄同体

从无性生殖到有性生殖,从雌雄同体到雌雄异体,是生物界由低等到高等的进化方向,也是生物生殖方式的重大变革。贝类属无脊椎动物软体动物门,处于这个漫长的性别进化过程的原始阶段,其性别表现存在着较复杂的情况。雌雄同体现象在双壳类出现得较为普遍,但目前的相关研究主要是在性腺组织学和群体的性别表现状况等方面。

#### 1.1 双壳类雌雄同体类型

有关海产双壳类的性别类型,一般划分为三种:一为雌雄异体,大部分双壳类都属于此类;二为一生中没有性转换的雌雄同体,如大扇贝 *Pecten maxima*、光滑蓝蛤 *Alloidis laevis*

等;三为生活周期的某阶段出现性反转,并有短时的雌雄同体现象<sup>[1]</sup>。近二十来年,关于第三类型的报道越来越多。廖承义曾在241个栉孔扇贝 *Chlamys* 性腺标本切片中,发现一个雌雄同体个体<sup>[1]</sup>;吴洪流等<sup>[2]</sup>发现波纹巴非蛤 *Paphia undulata* Born 中有雌雄同体个体;Pouvreau 等<sup>[5]</sup>发现,在一定条件下,珠母贝 *Pinctada margaritifera* 的雄性和雌性生殖性腺可以同时出现在同一个个体中,我们<sup>[6]</sup>在观察160个栉江珧标本时,发现10个雌雄同体个体;在检查马氏珠母贝养殖群体时,也发现雌雄同体的个体<sup>[9]</sup>。从上述报道,可以看出雌雄同体现象在双壳类不同物种中广泛存在,其出现几率在不同物种中差别较大,当然这个几率也可能会受季节、性腺发育状态甚至取样切片部位等的影响。

根据雌雄生殖细胞在性腺内的分布状况,处于雌雄同体时期的双壳类性腺可分为两种类型<sup>[10]</sup>:1)滤泡混合型(Mix-follicular type):这种类型在性变过程中,两性生殖细胞在同一滤泡中出现;2)滤泡并存型(Para-follicular type):这种类型的双壳类雌雄生殖细胞分别位于不同的滤泡中,雌雄滤泡并存于性腺中的不同区域。

#### 1.2 马氏珠母贝的雌雄同体

马氏珠母贝 *Pinctada mactensii* Dunker,也称合浦珠母贝,属软体动物门(Mollusca),瓣鳃纲(Lamellibranchia),珍珠贝科

收稿日期: 2006-10-09; 修订日期: 2007-03-26

基金项目: 淡水生态与生物技术国家重点实验室开放基金(06FB02)资助

作者简介: 于非非(1980—),女,汉族,山东威海人;硕士研究生;主要从事贝类分子生物学和发育生物学。E-mail: yufeifei2000@163.com

通讯作者: 余祥勇, Tel: 0759-2382184, E-mail: yuxyong@tom.com

(Pteriidae),主要分布于我国广西、广东及海南沿海,是我国人工培育海水珍珠最主要的母贝,所产珍珠产量占整个海水珍珠产量的95%以上。马氏珠母贝多数为雌雄异体,但在养殖群体中可以发现1%—5%的雌雄同体个体,并在一定条件下出现性转换。

马氏珠母贝中的雌雄同体现象也有不少报道。金启增等在徐闻于520个贝中发现了4个雌雄同体个体,在广东大亚湾于159个贝中发现1个雌雄同体<sup>[1]</sup>。沈亦平等通过对231个取自不同季节的马氏珠母贝性腺组织切片观察后发现,其中有4个个体为雌雄同体,具有精卵巢结构<sup>[8]</sup>。这表明在较长的时间跨度及不同的地域,马氏珠母贝群体中均存在雌雄同体现象。

## 2 性转换

### 2.1 性变方向

双壳类第一次性腺发育通常是某种性别占优势,随着贝龄的增加,另一种性别的个体所占比例将会增加。我们根据性腺组织切片,通过详细辨别雌雄生殖细胞在性腺内的状态,认为江珧的性变有三个趋向<sup>[10]</sup>:

1) 雄性向雌性转换:从组织学上看,滤泡壁上有较多的卵原细胞和卵黄形成期细胞,滤泡腔内没有或少有精原和精母细胞,但有较多的精子存在。雄性生殖细胞有被雌性生殖细胞取代的趋向。

2) 雌性向雄性转换:从组织学上看,性腺的滤泡内有精原细胞和较多的精母细胞,甚至在滤泡腔内还有少量精子存在。在同一或不同的滤泡内有少量残余的成熟卵和接近成熟的卵母细胞,没有或很少有未成熟的卵母细胞。雌性生殖细胞有被雄性生殖细胞取代的趋向。

3) 性腺均衡发育:雄性生殖细胞和雌性生殖细胞接近同步发育,两种生殖细胞在滤泡壁上和滤泡腔内所占空间比例相近。看不出明显的取代趋向。

关于马氏珠母贝的性变方向,目前一般认为是雄性先熟,第一次性发育雄性占优势,随着贝龄的增加,雌性所占比例将会越来越高,到3—4龄贝,雌性所占比例会大于雄性贝<sup>[3,5]</sup>。根据金启增等对湛江不同大小马氏珠母贝性比的研究认为,性别变化主要发生在低龄贝,由雄性向雌性转变;性转换的频率高于雌雄同体的出现率,由此推测马氏珠母贝的性转换过程比较快,在性变时,被取代的性细胞在滤泡内退化或消失。

### 2.2 转换性别的新配子细胞的来源

目前认为性转换发生时新配子细胞,有三种可能来源<sup>[3]</sup>:(1)在原始性别发育期间,有一个静止的两性生殖细胞潜在库,性逆转时,潜在库就开始产生相应的生殖细胞;(2)在早期发育中可能产生了两套分化的细胞,这两种细胞在第一成体性别期间一直保持着,当第二套分化细胞在整个性腺扩散时,就发生性转换;(3)两种性原细胞都是由相同的子细胞所产生,具体产生出哪种性原细胞,由内外因直接或间接控制干细胞来实现。

笔者认为马氏珠母贝比较符合第三种情况,即两种性原细胞由相同的原始生殖细胞产生。马氏珠母贝的雌雄同体在性变过程中两性生殖细胞可在同一滤泡中出现,可以推测第二性原细胞并不是在性转换时由滤泡外转移上去的,可能是在某些因子(类激素等)的作用下,滤泡内由原始生殖细胞停止生成第一性原细胞,转向生成第二性原细胞,从而出现性别转换。

### 2.3 性转换与自体受精

性转换的过程通常会伴随雌雄同体个体的出现,不少研究者关注同一个体的雌雄性细胞交配的结果会如何,国内外均开展了自然状态下为雌雄同体的扇贝的自体受精及其遗传效应的研究<sup>[11]</sup>。张国范等采取自交的方法来建立海湾扇贝自交系的尝试已取得初步成功<sup>[12]</sup>。近年来,我们对北部湾雷州半岛南部海域养殖的马氏珠母贝群体的性转换现象开展了研究,通过对马氏珠母贝成体性腺进行外观和切片观察,确认了马氏珠母贝性转换现象和雌雄同体个体的存在。为了探讨性转换及雌雄同体现象在马氏珠母贝育种中的应用,我们首先进行了雌雄同体个体的自体授精及其早期胚胎发育研究,发现部分胚胎可以发育成D型幼虫<sup>[9]</sup>;接下来通过马氏珠母贝雄贝标记养殖追踪性转换过程,进一步确证初始为雄贝的个体,在下一个繁殖期有约1%—3%的个体转化为雌性。同时结合精子超低温冷冻技术<sup>[13]</sup>,利用性转换过程开展了马氏珠母贝自交系的培育工作。

## 3 性转换机理

由于二十世纪分子生物学技术条件的限制,控制双壳类性别分化及转换的机理的问题,一直困扰着研究人员。随着技术的进步和研究的深入,双壳类性别决定和分化的机制已初露端倪。

生物体性别的形成主要取决于两个过程<sup>[15,16]</sup>:即性别决定与性别分化。性别决定<sup>[17]</sup>是指雌雄异体生物决定性别的方式,是遗传、环境、生理等因素的相互作用确定性别的发育趋向。性别分化<sup>[17]</sup>是指个体性腺性别和表型性别的发育过程,也就是遗传性别发育成表型性别的过程。生物体的性别决定与分化机制大致可以分为两大类<sup>[18]</sup>:一类为遗传决定机制(Genetic sex-determination system, GSD),即遗传因素决定性别;另一类为环境决定机制(Environmental sex-determination system, ESD),即初始的性别决定信号来自周围环境。前者主要指性染色体和性别决定基因的调控;后者主要是环境因子等外因的作用。

### 3.1 性染色体

脊椎动物和一些较高等的无脊椎动物的性别是由异型性染色体决定的,如蝗虫类的ZO型、双翅目、鳞翅目昆虫的ZW型、近方蟹属甲壳动物的XY型等。阎冰等报道马氏珠母贝的染色体数为N=14,2N=28<sup>[19]</sup>,沈亦平<sup>[20]</sup>也认为马氏珠母贝的染色体数目为N=14,2N=28。但他们报道的核型分析相差比较大,估计是种群的地理相隔<sup>[21]</sup>,未发现异型性染色体。因此笔者认为,贝类的进化地位比较低,其性

染色体没有分化或者分化不明显,因此并不是马氏珠母贝性别的决定与分化以及性别逆转的关键因素。

### 3.2 性别决定基因

目前研究较深入的与性别决定和分化有关的基因有很多,但大多数基因在各物种中的保守性较低,而 *Sox* 和 *Dmrt* 两个基因家族在线虫、果蝇、斑马鱼、小鼠等模式生物中却表现出高度的保守性,所以以下着重介绍 *Sox* 和 *Dmrt* 两个基因家族。

**Sox 基因** 1990 年<sup>[22]</sup>, Sinclair 等克隆到一个新的性别决定基因 *SRY* (sex-determining region Y)。1993 年, Huasu 等对 *SRY* 基因的结构、转录及启动子进行初步鉴定<sup>[23]</sup>,发现人类的 *SRY* 基因的开放阅读框架中有一段编码 79 个氨基酸、能与 DNA 特异结合的保守区,称为 HMG (High mobility group) box,具有高度的进化保守性。*SRY* 在未分化性腺的支持细胞前体细胞中表达,使其分化为睾丸足细胞,启动睾丸的分化<sup>[24]</sup>。

根据 HMG 的保守性,以它为探针在果蝇、鱼类、两栖类、鸟类和哺乳动物中都发现了 *SRY* 的同源基因 *Sox* (*SRY*-related HMG box) 基因。*Sox* 基因的共同特征是也具有 HMG box<sup>[22, 24]</sup>,与 *SRY* 基因具有 60% 以上的同源性,是一类高度保守的基因家族。在 *Sox* 家族成员中,已经研究确定与性别决定和分化有关的成员为 *Sox3*、*Sox9*、*Sox3* 可能通过其在脑的发育以及下丘脑诱导垂体的发育中的作用来影响性腺的功能<sup>[25]</sup>,也可能对正常的卵子发育、雄性性腺分化和配子发生是至关重要的<sup>[26]</sup>。*Sox9* 基因在雄性性别决定的过程中起关键作用,该基因所在区段的缺失将会导致雄性个体发生性反转现象<sup>[27]</sup>。*Sox* 基因家族其他成员,没有有力的证据表明他们是否在性别决定和分化中起重要作用。*SOX* 蛋白主要是通过与其他转录因子相互作用形成复合体而发挥作用,参与多种发育过程及性别分化的调控。

**Dmrt 基因** *Dmrt* (Double sex and Mab-3 related transcription factor) 基因家族是新发现的一个与性别决定相关的基因家族。该家族成员与果蝇的性别决定基因 Double sex (*dsx*) 和线虫性别决定基因 (*Mab-3*) 一样,所编码的蛋白质都包含一个具有 DNA 结合能力的保守基序,即 DM (Double sex 和 *Mab-3*) 结构域<sup>[28]</sup>,并以锌指结构与特异 DNA 序列相结合,通过调节目的基因转录发挥作用,主要参与性别决定与分化、早期胚胎发育及器官形成。

目前,已经发现 *Dmrt* 基因家族至少具有 7 个成员,研究确定与某些物种的性别决定和分化有关的成员为 *Dmrt1*。如对鱼类<sup>[29-31]</sup>、两栖类<sup>[32]</sup>、爬行类<sup>[33, 34]</sup>、鸟类<sup>[35, 36]</sup>、哺乳类<sup>[37, 38]</sup>的 *Dmrt1* 的研究表明,该基因的突变或缺失会导致动物由雄性转变为雌性,这说明 *Dmrt1* 在脊椎动物的性别分化中起着重要作用。Randy<sup>[39]</sup> 等认为,尽管 *Dmrt2* 对性别决定并不是必需的,但可能与 *Dmrt1* 类似,在性别分化中起着重要作用。*Dmrt* 基因家族其他成员,没有有力的证据表明他们是否在性别决定和分化中起重要作用。

对 *Sox* 和 *Dmrt* 两个基因家族的研究多集中在高等动物

中,少数低等的动物中也有报道。如在果蝇<sup>[40]</sup>、线虫<sup>[41]</sup>、海胆<sup>[42]</sup>中已克隆到 *Sox* 基因家族成员;果蝇<sup>[43]</sup>、线虫<sup>[44]</sup>、罗氏沼虾<sup>[45]</sup>、海鞘<sup>[46]</sup>中也有关于 *Dmrt* 基因家族成员的报道。但 *Sox* 和 *Dmrt* 基因家族是否在软体动物的性别决定和分化中起调控作用,到目前为止尚未见报道。为了揭示 *Sox* 和 *Dmrt* 基因在贝类中的保守性,了解贝类的性别决定和分化的分子机制,我们以马氏珠母贝为研究材料,根据 *Sox* 和 *Dmrt* 基因的保守序列设计了简并引物,在基因组中克隆到了 HMG 框和 3 个具有不同序列的 DM 结构域,并在 SMART cDNA 中克隆到 *Sox4* 和 *Dmrt2*、*Dmrt5* 基因全长,RT-PCR 显示,*Dmrt2* 在雌雄性腺中表达有很大差异(待发表)。上述的研究结果表明,在马氏珠母贝中同样存在 *Sox* 和 *Dmrt* 基因,并且 *Dmrt2* 可能在贝类的性别决定和分化中起着重要作用。

### 3.3 环境生态因素

双壳类性别转换可能涉及性别决定与分化相关基因等遗传因素的影响,还受环境生态因素等的影响。主要有下列因素可以改变双壳类的性别表现状况:

**营养条件** 将牡蛎的鳃切除 1/3 以减少其获得营养物质机会,放养在海水中,发现在群体中雄性占优势<sup>[14]</sup>。良好的营养条件有利于僧帽牡蛎发育为雌性,此时群体中雌贝所占的比例明显增高;而在营养条件差时,雌性僧帽牡蛎会经雌雄同体转变为雄性,群体中雄性所占比例增高<sup>[4]</sup>。Pourvreau<sup>[5]</sup> 等报道,好的营养条件可促进珠母贝由雄性转变为雌性。在环境因子对性转换的影响中,营养条件有较强的效果。

**水温** 产在丹麦的食用牡蛎的性别与水温有关,水温高,雌性占优势,水温低,雄性占优势<sup>[14]</sup>。美国牡蛎也有这种现象,当幼蛎第一次性成熟时,在较寒冷地区雄性占 70%—80%;而在较暖和的地区,雌性超过了 95% 以上<sup>[14]</sup>。金启增等报道<sup>[3]</sup> 马氏珠母贝培养过程中,水温升高,通常雌贝占优势;若水温降低,雄贝比例有所提高。有人观察贻贝性别转变与水温的关系是:当月平均水温 13.2—19.9℃ 时,雄性百分数最高;当月平均水温升高到 20—29.3℃ 时,雌雄性比的比例相接近;以后随着水温下降,雄性比例又上升<sup>[14]</sup>。这显示水温低,雄性比例占优势,反之,雌性比例会增加。

**群体性别构成** 把雌性僧帽牡蛎单独放养在水槽中,他们有慢慢变成雌雄同体的倾向,以后可以变成雄性<sup>[14]</sup>;对雌雄马氏珠母贝进行人为的群体隔离有利于向另一种性别转化<sup>[4]</sup>;胡建兴等<sup>[3]</sup>也认为当人为使马氏珠母贝群体成为单性群体时,有利于诱导个体产生性转换成另一种性别,直至群体内的性比例趋于正常。说明性转换还受到群体性别构成因素的影响。

我们也曾以江珧为材料探讨过环境对双壳类性别转换的影响。通过对江珧科性腺的组织学研究,我们推测江珧个体在受精及发育一段时间后,还存在发育成不同性别的潜能,外源因素(水温、营养条件等)可引起贝体内的神经或内分泌的变化,这些变化将影响性腺中的某些靶细胞的代谢方式,从而最终导致性变过程的发生<sup>[13]</sup>。但性别决定基因和

环境因子在双壳类性别转换中,何者占主导地位,有待于进一步研究。

### 3.4 性别转换机理研究中的主要问题

迄今为止,已有人通过改变营养<sup>[5,14]</sup>、水温<sup>[3]</sup>、性别比例<sup>[4,14]</sup>等外界条件,成功诱导了马氏珠母贝的性别转换。另外,我们也开展了一些遗传因素方面的研究,成功克隆和筛选了与马氏珠母贝的性别转换相关的 *Sox* 和 *Dmrt* 基因,但在进一步研究这些基因的作用机制时,遇到了困难。传统的研究某基因的作用机制的方法,一般是通过显微注射,抑制基因表达或使其过表达,通过观察注射后个体发育表型的变化,探讨该基因的作用方式。但由于双壳类的受精卵比较小,透明度比较差,且卵壳相对较硬,限制了显微注射技术的应用。因此,开发适用于双壳类的结构特点的新技术,以进一步探讨性别转换相关基因的作用机制,是目前亟待解决的问题。

综上所述,贝类处于漫长的性别进化过程的原始阶段,性别表现形式多样。揭示贝类的性别决定和分化的分子机制具有重要的理论意义,它可以丰富和补充动物性别决定和分化的模型,同时有助于阐明性别决定模式进化等理论问题。

我们已经在马氏珠母贝中鉴定到 *Sox* 和 *Dmrt* 基因,且初步实验结果表明 *Dmrt2* 在雌雄性腺中表达有很大差异。因此,进一步揭示 *Sox* 和 *Dmrt* 基因家族成员在贝类雌雄性腺中时空表达差异以及生物学功能,对于探讨贝类的性别决定和分化机制具有重要意义,也可促进贝类性别的人工控制和良种选育工作的开展。

### 参考文献:

- [1] Liao C Y,Xu Y F,Wang Y L. The procreation circle of *Chlamys Aterri* [J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*,1983,7(1):1—2[廖承义,徐应馥,王远隆.栉孔扇贝的生殖周期.水产学报,1983,7(1):1—2]
- [2] Wu H L,Wu C Y,Chen X F. Histological studies on male gonad in *Paphia*(*Paratapes*) undulate [J]. *Natural Science Journal of Hainan University*,2000,18(2):169—174[吴洪流,伍春雨,陈雪芬.波纹巴非蛤雄性生殖腺的组织学观察.海南大学学报(自然科学版),2000,18(2):169—174]
- [3] Hu J X. The production of pearl oyster [M]. The seeds biology of pearl oyster [A]. Beijing:Ocean Press. 1992,20—23[胡建兴.珍珠贝繁殖(第二章).珍珠贝种苗生物学.北京:海洋出版社,1992,20—23]
- [4] Hu J X,Li H ,Guo CL , et al. The seedling and propagation biology of *Chlamys Nobilis* [M]. The androgynous phenomena and sex reversal of *Chlamys nobilis* [A]. Beijing:Science Press. 1996,120—126[胡建兴,黎辉,郭澄联,等.华贵栉孔扇贝雌雄同体及其性转换.华贵栉孔扇贝育苗与养殖生物学.北京:科学出版社. 1996,120—126]
- [5] Pouvreau S,Gangnery A , et al. Gametogenic cycle and reproductive effort of the tropical blacklip pearl oyster, *Pinctada margaritifera* (Bivalvia:Pteriidae) ,cultivated in Takapotoatoll (French Polynesia) [J]. *Aquat. Living Resour*,2000,13(1):37—48
- [6] Wang M F,Yu X Y,Ye F L. The gonad development of *Pinna*(*Atrina*) *pectinata* in Beibu gulf and adjoining coast [J]. *Guangxi Sciences*,2000,7(2):140—143,157[王梅芳,余祥勇,叶富良.北部湾及附近海域栉江珧性腺发育的研究.广西科学,2000,7(2):140—143,157]
- [7] Xiong D R. The research on pearl [M]. Beijing:Agriculture Press. 1965,82—84[小村新二郎,渡部哲光著,熊大仁译.珍珠的研究.北京:农业出版社,1965,82—84]
- [8] Shen Y P. A primary study on sex reversal of *Pinctada martensii* Dunker [J]. *Journal of Wuhan University*,1990,(4):117—118[沈亦平.合浦珠母贝性变现象的初步研究.武汉大学学报,1990,(4):117—118]
- [9] Wang M F,Yu X Y,Liu Y , et al. Study on hermaphrodites and self-fertilization of the pearl oyster *Pinctada martensii* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*,2006,30(4):420—424[王梅芳,余祥勇,刘永,等.马氏珠母贝雌雄同体和自体受精的研究.水生生物学报,2006,30(4):420—424]
- [10] Wang M F,Yu X Y,Wang J Y. The androgynous phenomena and sex reversal of two *Pinna*(*Atrina*) *pectinata* [J]. *Journal of Zhanjiang Ocean University*,1999,19(4):6—10[王梅芳,余祥勇,王君彦.两种栉江珧雌雄同体及性转化现象.湛江海洋大学学报,1999,19(4):6—10]
- [11] Zheng H P,Zhang G F , et al. Establishment of different shell color lines of bay scallop *Argopecten irradians* Lamarck(1819) and their development [J]. *Oceanologia Et Limnologia Sinica*,2003,(6):632—639[郑怀平,张国范,等.不同贝壳颜色海湾扇贝家系的建立及生长发育研究.海洋与湖沼,2003,(6):632—639]
- [12] Zhang G F,Liu S X , et al. Self-fertilization family establishment and its depression in bay scallop *Argopecten irradians* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*,2003,(6):233—237[张国范,刘述锡,等.海湾扇贝自交家系的建立和自交效应.中国水产科学,2003,(6):233—237]
- [13] Wang M F,Yu X Y,Liu Y , et al. Study on cryopreservation of spermatozoa in *Pinctada martensii* [J]. *Journal of Fisheries of China*,2006,30(2):170—174[王梅芳,余祥勇,刘永,等.马氏珠母贝精子的超低温保存.水产学报,2006,30(2):170—174]
- [14] Cai Y Y,Zhang Y ,Wei R F. The conspectus of seashell [M]. The physiology of seashell [A]. Shanghai:Shanghai Science and Technology Press. 1995,153—155[蔡英亚,张英,魏若飞.贝类学概论.贝类的生理(第五章).上海:上海科学技术出版社. 1995,153—155]
- [15] Zhou L Y,Zhang X Y,Wang D S. Advances on molecular mechanism of sex determination and differentiation of vertebrates [J]. *Zoological Research*,2004,25(1):81—88[周林燕,张修月,王德寿.脊椎动物性别决定和分化的分子机制研究进展.动物学研究,2004,25(1):81—88]
- [16] Lou Y D,Liu Y H,Qiu G F. Advances in sex determination of shrimps (prawns) and crabs [J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*,2004,13(2):157—162[楼允东,刘艳红,邱高峰.虾蟹类性别决定研究进展.上海水产大学学报,2004,13(2):157—162]
- [17] Zhang Y. The research on sex-determine gene of altitude animals [J].

- Livestock and Poultry Industry*, 2005, 9:40—43 [张谊. 高等动物性别决定基因的研究进展. 畜牧兽医, 2005, 9:40—43]
- [18] Nie L W, Shan X N, Wang M, et al. The conservative region sequence analysis of four *Sox* genes in the *Trionyx sinensis* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2001, 25(3): 245—250 [聂刘旺, 单祥年, 汪鸣, 等. 中华鳖 4 个 *Sox* 基因保守区的序列分析. 水生生物学报, 2001, 25(3): 245—250]
- [19] Yan B, Wang A M, Ye L, et al. The karyotype of the diploid and triploid *Pinctada martensii* [J]. *Guangxi Science*, 1999, 6(3): 219—221 [阎冰, 王爱民, 叶力, 等. 二倍体及三倍体马氏珠母贝核型. 广西科学, 1999, 6(3): 219—221]
- [20] Shen Y P, Wang X J, et al. A technique for preparation of metaphase chromosome from mantle tissue of adult pearl oyster *Pinctada martensii* Dunker [J]. *Journal of Wuhan University*, 1993, (5): 121—122 [沈亦平, 王孝举, 等. 合浦珠母贝贝外套膜染色体制备技术. 武汉大学学报(自然科学版), 1993, (5): 121—122]
- [21] He M X, Jiang W G. The advances of genetics and breeding in *Pinctada martensii* (D) [J]. *Transaction of Oceanology and Limnology*, 2000, (1): 75—82 [何毛贤, 姜卫国. 合浦珠母贝遗传育种研究进展. 海洋湖沼通报, 2000, (1): 75—82]
- [22] Sinclair A H, Berta P, Palmer M S, et al. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif [J]. *Nature*, 1990, 346: 240—254
- [23] Hua S, Chris L. Identification of the transcriptional unit, structural organization and promoter sequence of the human sex-determining region *Y* (*SRY*) gene using reverse genetic approach [J]. *American Journal of Human Genetics*, 1993, 52(132): 24—30
- [24] Capel B. The battle of the sexes [J]. *Mech Dev*, 2000, 92(1): 89—103
- [25] Yao B, Zhou L, Gui J F. Studies on cDNA cloning and temporal and spatial expression of *Sox3* gene in Grouper *Epinephelus coioides* [J]. *High Technology Letters*, 2003, (5): 74—81 [姚波, 周莉, 桂建芳. 斜带石斑鱼 *Sox3* 基因 cDNA 的克隆及其时空表达特征分析. 高技术通讯, 2003, (5): 74—81]
- [26] Weiss J, Meeks J J, Hurley L, et al. *Sox3* is required for gonadal function, but not sex determination, in males and females [J]. *Molecular Cell Biology*, 2003, 23: 8084—8091
- [27] Smith J M, Koopman P A. The ins and outs of transcriptional control: nucleocytoplasmic shuttling in development and disease [J]. *Trends in Genetics*, 2004, 20: 4—8
- [28] Mariko K, Alexander F, Akiko K. Molecular cloning and characterization of *Dmrt* genes from the medaka *Oryzias latipes* and the platyfish *Xiphophorus maculatus* [J]. *Gene*, 2002, 295(2): 213—222
- [29] Yang D, Yu L N. Sex and sex identification of fish [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, 30(2): 221—226 [杨东, 余来宁. 鱼类性别与性别鉴定. 水生生物学报, 2006, 30(2): 221—226]
- [30] Brunner B, 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: 8—17
- [31] Veith A M, et al. Cloning of the *Dmrt1* gene of *Xiphophorus maculatus*: *dmrtY* is not the master sex-determining gene in the platyfish [J]. *Gene*, 2003, 317: 59—66
- [32] Osawa N, Oshima Y, Nakamura M. Molecular cloning of *Dmrt1* and its expression in the gonad of *Xenopus*, *Zoologische Sciencess*, 2005, 22: 681—687
- [33] Kettlewell J R, Raymond C S, Zarkower D. Temperature-dependent expression of turtle *Dmrt1* prior to sexual differentiation [J]. *Genesis*, 2000, 26: 174—178
- [34] Sreenivasulu K, Ganesh S, Raman R. Evolutionarily conserved *Dmrt1* encodes alternatively spliced transcripts and shows dimorphic expression during gonadal differentiation in the lizard, *Calotes versicolor* [J]. *Gene Expression Patterns*, 2002, 2: 51—60
- [35] Smith C A, McClive P J, Western P S, et al. Conservation of a sex-determining gene [J]. *Nature*, 1999, 402: 601—602
- [36] Shetty S, Kirby P, et al. *Dmrt1* in a ratite bird: evidence for a role in sex determination and discovery of a putative regulatory element Cyto-gene [J]. *Genome Research*, 2002, 99: 245—251
- [37] Raymond C S, Murphy M W, O'Sullivan M G. *Dmrt1*, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation [J]. *Genes Development*, 2000, 14: 2587—2595
- [38] Pask A J, Behringer R R, Renfree M B. Expression of *Dmrt1* in the mammalian ovary and testis: From marsupials to mice, *Cytogenetics and Genome Research*, 2003, 101: 229—236
- [39] Seo K W, Wang Y, Kokubo H, et al. Targeted disruption of the DM domain containing transcription factor *Dmrt2* reveals an essential role in somite patterning [J]. *Developmental Biology*, 2006, 290(1): 200—210
- [40] DeFalco T J, Vernev G, Jenkins A B, et al. Sex-specific apoptosis regulates sexual dimorphism in the *Drosophila* embryonic gonad [J]. *Developmental Cell*, 2003, 5(2): 205—216
- [41] Nelms B L, Hanna-Rose W. C. elegans HIM-8 functions outside of meiosis to antagonize EGL-13 Sox protein function [J]. *Developmental Biology*, 2006, 293(2): 392—402
- [42] Kenny A P, Kozlowski D, Oleksyn D W. SpSoxB1, a maternally encoded transcription factor asymmetrically distributed among early sea urchin blastomeres [J]. *Development (Cambridge, England)*, 1999, 126: 5473—5483
- [43] Wolff J N, Zarkower D. Evolutionary dynamics of the DM domain gene family in Metazoans [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2003, 57: 241—249
- [44] Cremazy F, Berta P, Grard F. Genome-wide analysis of *Sox* genes in *Drosophila melanogaster* [J]. *Mechanisms of Development*, 2001, 109: 371—375
- [45] Peng Q L, Pu Y G, Cheng Z H, et al. Sequence analysis of three *Dmrt* genes in *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2005, 12(1): 5—9 [彭巧玲, 蒲友光, 程子华, 等. 罗氏沼虾 3 个 *Dmrt* 基因的序列分析. 中国水产科学, 2005, 12(1): 5—9]
- [46] Leveugle M, Prat K, Popovici C. Phylogenetic analysis of *Ciona intestinalis* gene superfamilies supports the hypothesis of successive gene expansions [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2004, 58(2): 168—181