

龟鳖类温度依赖型性别决定机制的研究进展

贺斌^① 史海涛^{①②*} 廖广桥^①

(^① 海南师范大学生命科学学院 海口 571158; ^② 中国科学院成都生物研究所 成都 610041)

摘要: 近几十年来,发现很多爬行动物具有温度依赖型性别决定机制(TSD),即性别分化取决于胚胎发育过程中温度敏感期(TSP)的环境温度高低。龟鳖类存在两种 TSD 模式,即低温产雄性、高温产雌性的 TSD I_a,低温、高温均产雌性而中间温度产雄性的 TSD II。TSD 机制在生理水平的作用机制主要受到性腺类固醇激素的控制,温度通过影响芳香化酶和 5 α -还原酶的活性控制雌、雄激素转化,进而决定了个体的性别分化。在分子水平的研究发现: *Sf1*、*Mis*、*Sox9*、*Dax1*、*Wt1* 和 *Dmrt1* 等基因的表达受到温度的影响,参与了龟鳖类性别分化。介绍了关于 TSD 的进化意义提出的假说,有待进一步验证。

关键词: 龟鳖类;温度依赖型性别决定;研究进展

中图分类号:Q955 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2009)05-147-06

Temperature-dependent Sex Determination in Turtles

HE Bin^① SHI Hai-Tao^{①②*} LIAO Guang-Qiao^①

(^① College of Life Science, Hainan Normal University, Haikou 571158;

^② Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China)

Abstract: Temperature-dependent sex determination (TSD) has been studied extensively over the past several decades in a variety of reptiles. Sexual differentiation of gonads is sensitive to temperature during thermosensitive period (TSP). Two patterns have been demonstrated in chelonians: ① males from cool temperature while females from warm temperature (TSD I_a) and ② females from both cool and warm temperatures, while males from intermediate temperature (TSD II). The possible mechanisms of TSD caused by sex steroid hormone levels have been studied. Several groups have provided direct support for the hypothesis that the physical stimulus of temperature is transduced into an endocrine signal that directs the sex-determination process; specifically, estrogens and their precursors, aromatizable androgens, stimulate the female-determining cascade and inhibit the male determining cascade. Preliminary results show that expression of *Sf1*, *Mis*, *Sox9*, *Dax1*, *Wt1* and *Dmrt1* is affected by temperature, which may be involved in sex determination. Hypotheses on the evolutionary significance of TSD are introduced, and each of these explanations remains partly but not fully plausible.

Key words: Chelonian; Temperature-dependent sex determination (TSD); Progresses

爬行动物的一些种类具有温度依赖型性别决定机制 (temperature-dependent sex determination, TSD)。1977 年, Charnov 等提出了“环境性别决定”一说,认为 TSD 有利于适应功能^[1]。此前,这一观点没有得到证实,部分原因是设计“对照实验”存在困难。最近, Warner 等在《Nature》上报道了他们利用一种寿命很短的澳大利亚蜥蜴

基金项目 海南省研究生创新科研课题 (No. Hxwxy2008-19), 国家自然科学基金项目 (No. 30660026);

* 通讯作者, E-mail: haitao-shi@263.net;

第一作者介绍 贺斌,男,硕士研究生;研究方向:龟鳖类生殖生物学;E-mail: hebin.1231@163.com。

收稿日期:2009-04-08, 修回日期:2009-06-23

(*Amphibolurus muricatus*)通过激素处理,证实了Charnov-Bull模型是正确的^[2]。近年来,随着与龟鳖类性别决定相关的一些基因,如 *Sox9*、*Sf1* 和 *Mis* 等基因的成功克隆,关于龟类 TSD 的研究进入新的阶段^[3,4]。全球气候变化,尤其是气温升高对龟类孵化和性比率的干扰,将成为龟类保护生物学的重要课题^[5,6]。有关龟类性别决定机制的研究,在其生理学和分子机制及进化意义方面,国外学者进行了深入研究,国内仅见部分基础数据报道。鉴于龟鳖类 TSD 机制的理论研究对发育生物学、进化生物学和保护生物学都有重要意义,对龟鳖类生产养殖也有较大价值,本文从 TSD 类型、生理和分子机制及进化意义方面进行了综述。

1 TSD 类型

温度敏感期 (temperature sensitive period, TSP)是指动物胚胎发育的某一特定阶段,在该阶段内孵化温度能对它的性别起决定作用,发育的胚胎能够使其性别逆转的时期。淡水龟鳖类的胚胎发育可分为 27 期^[7,8],而海龟一般分为 31 期^[8]。温度敏感期在胚胎发育的 14~21 期之间,存在种间差异和性别间差异,如红耳龟 (*Trachemys scripta*) 雄性在 16~21 期,雌性在 17~19 期。自然条件下,巢址温度处于波动状态,此时性别比例取决于温度敏感期内温度高于或者低于临界温度的比例^[9]。

Ewert 等根据前人的研究工作,结合自己的研究结果,将已研究过的爬行动物的 TSD 总结为三种类型:低温产雄性,高温产雌性,即 MF (TSD I a);低温产雌性,高温产雄性,即 FM (TSD I b);低温和高温均产雌性,中间温度产雄性,即 FMF (TSD II)。在爬行类,已知所有类群(龟鳖类、鳄类和蜥蜴类)中都存在 TSD II。TSD I a 只在龟鳖类中存在。TSD I b 在龟鳖类中没有发现。由于 TSD II 在爬行类三个主要类群中都存在,它可能是 TSD I a 和 TSD I b 的基础或原始模型^[10]。

表 1 已报道具有 TSD 或 GSD 的龟鳖目动物

Table 1 Patterns of sex determination for chelonian species

学名 Species	类型 Pattern	参考文献 References
淡水龟科 Bataguridae		
乌龟 <i>Mauremys reevesii</i>	TSD I a	①
黄喉拟水龟 <i>M. mutica</i>	TSD I a	[11]
印度黑龟 <i>Melanochelys trijuga</i>	TSD II	[10]
木纹鼻龟 <i>Rhinoclemmys pulcherrima</i>	TSD I a	[10]
海龟科 Cheloniidae		
鳄龟科 Chelydriidae	TSD II	[13, 14]
棱皮龟科 Demochelyiidae		
龟科 Emydidae		
锦龟 <i>Chrysemys picta</i>	TSD I a	[16]
木雕水龟 <i>Clemmys insculpta</i>	GSD	[17]
布氏拟龟 <i>Emydoidea blandingii</i>	TSD I a	[18]
欧洲池龟 <i>Emys orbicularis</i>	TSD I a	[12]
地理图龟 <i>Graptemys geographica</i>	TSD I a	[16]
矩斑图龟 <i>G. ouachitensis</i>	TSD I a	[16]
镰斑图龟 <i>G. pseudogeographica</i>	TSD I a	[16]
菱斑龟 <i>Malaclemys terrapin</i>	TSD I a	[19]
优雅伪龟 <i>Pseudemys concinna</i>	TSD I a	[10]
卡罗来纳箱龟 <i>Terrapene carolina</i>	TSD II	[10]
饰纹箱龟 <i>T. ornata</i>	TSD I a	[17]
红耳龟 <i>Trachemys scripta elegans</i>	TSD I a	[16]
潮龟科 Geoemydidae		
大东方龟 <i>Heosemys grandis</i>	TSD II	[10]
动胸龟科 Kinosternidae		
果壳动胸龟 <i>Kinosternon baurii</i>	TSD II	[10]
淡黄动胸龟 <i>K. flavescens</i>	TSD II	[17]
白喙动胸龟 <i>K. leucostomum</i>	TSD II	[10]
红面动胸龟 <i>K. scorpionoides cruentatum</i>	TSD II	[10]
剃刀动胸龟 <i>Sternotherus carinatus</i>	TSD II	[10]
平背麝香龟 <i>S. minor</i>	TSD II	②
臭动胸龟 <i>S. odoratus</i>	TSD II	[17]
侧颈龟科 Pelomedusidae		
钢盔侧颈龟 <i>Pelomedusa subrufa</i>	TSD II	[10]
西非侧颈龟 <i>Pelusios castaneus</i>	TSD II	[10]
红头侧颈龟 <i>Podocnemis expansa</i>	TSD I a	[10]
黄斑侧颈龟 <i>P. unifilis</i>	TSD I a	[10]
麝香龟科 Staurotypidae		
黄喙麝香龟 <i>Staurotypus sabini</i>	GSD	[10]
斑喙麝香龟 <i>S. triporcatus</i>	GSD	[10]
陆龟科 Testudinidae		
扁平陆龟 <i>Malacochersus tornieri</i>	TSD I a	[20]
鳖科 Trionychidae		
美国鳖 <i>Apalone mutica</i>	GSD	[21]
美洲鳖 <i>A. spiniferus</i>	GSD	[16]
中华鳖 <i>Pelodiscus sinensis</i>	?	[22, 23, 24]

? 示不同报道中模式存在分歧;GSD 示遗传依赖型性别决定。
 ? Data on sex determination were questionably;GSD·Genetic sex determination.

①李珊·孵化温度对乌龟性别分化影响的研究·长沙:湖南师范大学硕士学位论文·2002.

②Etchberger C R·The reproductive biology of *Sternotherus minor minor* (Reptilia: Testudines: Kinosternidae) from the southern part of its range in central Florida·Unpubl M S Thesis·Orlando, Florida·University of Central Florida·1984.

2 TSD 机制

2.1 类固醇激素中心假说 类固醇激素作用对龟类 TSD 机制的解释是比较成功的。在爬行类性腺发生上,精巢来自双向潜能性腺髓质的发育和皮质的退化;卵巢刚好相反,来自双向潜能性腺皮质的发育和髓质的退化。雌激素在该过程中起重要作用;它对双向潜能性腺的皮质和髓质的发育分别起促进和抑制作用,从而决定性腺的雌性发育方向^[25, 26]。经过对拥有 TSD 机制的物种重复试验,结果表明:芳香化酶处理使雄性发育温度下胚胎全部雌性化^[27];同样,使用芳香化酶抑制剂处理,使低温和高温下孵化的欧洲池龟全部为雌性^[28]。基于此,芳香化酶被认为是将睾酮等雄性激素转化为雌激素的关键因子,决定了个体的性别^[27]。在红耳龟温度敏感期内,胚胎脑内芳香化酶的活性雌性明显高于雄性,之后该酶活性在雌雄均降低^[29]。Jeyasuria 对菱斑龟的研究发现,在产雌性温度条件下肾上腺-肾-性腺复合体(adrenal-kidney-gonad complex, AKG)中芳香化酶 mRNA 含量增加^[30]。如果这个假说成立,应该存在热敏感调节芳香化酶基因转录的机制。孵化温度通过影响胚胎代谢的快慢,引起体液 CO₂ 浓度变化,再引起 pH 的变化,进而影响 5 α -还原酶的活性,5 α -还原酶与芳香化酶竞争性地与睾酮结合,从而引起其后级联反应的发生^[30]。但此结论只说明 pH 与 5 α -还原酶活性的关系,却没有指出 pH 与芳香化酶活性的关系,这与目前普遍接受的芳香化酶是性别决定中的主导因子的结论相矛盾。CO₂ 影响性别决定,通过降低血液 pH 使个体雌性化,这个推论在红耳龟和伪图龟的实验上得到了证明^[31]。

2.2 分子水平的研究

2.2.1 类固醇生成因子(steroidogenic factor-1, Sf1) Sf1 基因是性别决定基因级联通路上的一个开关,该开关受上游基因或雌激素和温度的调节,从而决定 Sf1 的激活对象^[4, 32]。Sf1 在精巢发育中激活 Mis 基因的表达, Mis 是在雄性性别决定级联通路中表达的基因^[33]。Sf1 控

制了包括芳香化酶在内的性腺类固醇发生酶的表达^[34]。Valenzuela 等使用属于 TSD 机制的锦龟和属于 GSD 机制的美国鳖进行了对比实验,认为 Sf1 在 TSD 机制的种类中的表达受到温度的影响,而 GSD 种类不会,且两者只有在温度敏感期内表达有差异。在不同的 TSD 种类中, Sf1 的表达方式存在种间差异^[33, 34]。在锦龟和红耳龟进行试验,结果得到: Sf1 在产雄性温度下的表达高于雌性,但是实验并未证明 Sf1 调节芳香化酶的表达^[35, 36]。

2.2.2 缪勒氏管抑制素(Müllerian inhibiting substance, Mis) 即抗 Müllerian 管激素(anti-Müllerian hormone, AMH), Mis 基因已在红耳龟胚胎得到克隆^[36],在 AKG 和性腺均有表达。研究表明,早期胚胎中(15 期以前) Mis 的表达在产雌、雄性温度下是相似的。Mis 的表达限制了缪勒氏管的形成,使其雄性化。在 17 期,产雄性温度下胚胎性腺的 Mis 上调而在产雌性温度下下降。19~23 期,睾丸对 Mis 的表达加强^[37]。Mis 是否像在哺乳动物中一样调控了 Sox9 的表达,有待研究。

2.2.3 SRY 样 HMG 盒(SRY-like HMG box, Sox9) 对龟 Sox9 的研究发现,其也是雄性性别决定级联通路上的基因之一,受到 Sf1 的激活作用,且它不调节 Mis 基因的表达,这意味着 Sox9 及其下游级联通路是 Sf1 作用的另外一个分支^[4]。八孔海龟(*Lepidochelys olivacea*) Sox9 的表达受温度调控:在产雄性温度和产雌性温度孵化胚胎的温度敏感期(21~25 期)都有表达,产雌性温度下孵化胚胎发育的 26~27 期, Sox9 的表达出现下调^[38]。对红耳龟的研究发现,AKG 中 Sox9 在 TSP 及 TSP 后表达^[3]。

2.2.4 X 连锁的性逆转基因(DSS-AHC critical region on the X chromosome, Dax1) Dax1 分别在产雌、雄性温度下的温度敏感期表达。在锦龟的研究中, Dax1 的表达在第 15 期出现两性差异,而在八孔海龟的研究中, Dax1 在两种温度下都是第 23~26 期表达。在第 27 期时两者表达差异显著,即 Dax1 在性别分化以后发挥作用。同样,在红耳龟和蛇鳄龟(*Chelydra*

serpentina) 温度敏感期内不同温度下表达都没有明显差别^[38,39]。该基因的表达在该物种中与 TSD 有无关联有待进一步研究^[4,38]。

2.2.5 威尔氏瘤抑制基因 (Wilms' tumor suppressor gene 1, *Wt1*) 在红耳龟的研究中发现 *Wt1* 在两性感腺发育中发挥作用, 在 TSP (14~20 期) 没有显著差异, 在 20~23 期表达上调, 且 *Wt1* 蛋白促进了性腺细胞增殖^[40,41]。在锦龟研究中, 只有第 12 期出现雌雄间表达的显著差异, 产雄性温度下的表达高于雌性, 在上游调节 *Sf1* 的生成。推测 *Wt1* 单独或联合 *Sf1* 引起级联反应, 分化出两性性索^[34,42]。

2.2.6 *Dmrt1* (DM-related transcription factor 1)

Dmrt1 是第一个被发现的在性别决定之前受到温度影响表达的基因^[43]。在红耳龟和太平洋丽龟的研究中发现, *Dmrt1* 的表达也是温度依赖的: 在产雄性温度和产雌性温度下孵化, 胚胎的生殖嵴和中肾复合物都有表达, 但到温度敏感期后期, 产雄性温度发育胚胎性腺的 *Dmrt1* 表达水平平均高于雌性^[44]。且其性别特异性的表达早于 *Sox9* 的性别特异性表达, 因此认为 *Dmrt1* 可能作用于 *Sox9* 的上游^[45]。另有报道在 TSP 使用外源雌激素处理抑制了 *Dmrt1* 的表达^[46]。具体 *Dmrt1* 在 TSD 中的功能有待进一步研究。

3 TSD 进化意义

目前还没有确切证据能证明 TSD 的进化优势, 但是有很多的假说提出来。

3.1 避免近亲繁殖假说 (Inbreeding avoidance hypothesis) 该假说认为同一窝所产生的所有个体均为单一性别, 减少了与兄弟姐妹交配的可能性, 有效地避免了近亲繁殖^[47]。但是这个假说对长寿命的龟鳖类而言, 因其成体每年都参与繁殖, 不能避免不同年份产生的个体相互交配。

3.2 性二态假说 (Sexual size dimorphism hypothesis) 不同的温度造就了雌雄个体生长速度的不同, 提高两性在各自繁殖角色的优势, 最终影响到个体繁殖的适合度。比较发现:

TSD I a 的雌性个体都大于雄性, 温度较高产雌性, 使得雌性生长较快; 相反, TSD II 的雌性个体一般不大于雄性^[10]。近年的研究发现, 存在不少例外, 如扁平陆龟 (TSD I a), 尽管雌性成体大于雄性, 但是雄性生长速度大于雌性^[24]。

3.3 避免捕食策略假说 (Predator-avoidance strategies) 不同温度条件下产生的雌雄个体更有效地避免天敌, 从而提高其适合度。有报道表明, 中间温度产生的蛇鳄龟个体倾向于拥有更高的运动能力, 产雄性温度和产雌性温度产生的后代运动量较少, 在半自然条件下的实验表明, 一年内中间温度产生的个体被捕食率明显高于其他个体, 推测可能是因为其活动多而易暴露^[48]。但是该结论只是在这一个物种, 而自然选择是在所有物种中进行, 故而有待进一步验证。

4 展望

在龟鳖类 TSD 研究中, 通过深入研究 TSD 三种模式 (MF、FM、FMF), 有助于探讨龟鳖类与其他爬行类之间的系统进化关系。研究表明通过改变孵化环境 CO₂ 的浓度, 可以在一定程度上控制红耳龟性别, Etchberger 认为是通过改变内环境 pH 影响酶的表达^[31], 同时, 有研究表明龟的血液 pH 在性别决定时期发生变化^[49], 因此, 研究 CO₂ 和胚胎内环境 pH 等因子在 TSD 机制中的作用, 比较 MF 型及 FMF 型种类在高浓度 CO₂ 条件下芳香化酶的活性和性别分化, 将有助于揭示温度与性别决定基因表达间的关系。近年来新的实验技术和方法的使用极大地推动了对龟鳖类 TSD 的理解和认识。其中差异技术、功能基因组学、基因功能表达系列分析技术、基因芯片技术和日益完善的生物信息分析系统, 都将加速对性别决定和分化这一复杂基因网络的认知。全球气候变化, 尤其是气温升高、酸雨等对龟类胚胎发育将造成严重影响, 影响 TSD 机制, 使种群性比率偏离 1:1 的稳定模式, 导致种群数量减少甚至是物种灭绝, 这应该成为保护生物学关注和研究的重点课题。

参 考 文 献

- [1] Charnov E L, Bull J J. When is sex environmentally determined. *Nature*, 1977, **266**: 828~830.
- [2] Warner D A, Shine R. The adaptive significance of temperature-dependent sex determination in a reptile. *Nature*, 2008, **451**: 566~568.
- [3] Shoemaker C, Ramsey M, Joanna Q, et al. Expression of *Sox9*, *Mis*, and *Dmrt1* in the gonad of a species with temperature-dependent sex determination. *Developmental Dynamics*, 2007, **236**: 1 055~1 063.
- [4] Christina M S, Crews D. Analyzing the coordinated gene network underlying temperature-dependent sex determination in reptiles. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2009, **20** (3): 293~303.
- [5] Janzen F J. Climate change and temperature-dependent sex determination in reptiles. *PNAS*, 1994, **91**: 7 487~7 490.
- [6] Gibbons J W, Scott D E, Ryan T J, et al. The global decline of reptiles, Déjà Vu amphibians. *Bio Science*, 2000, **50**: 653~666.
- [7] Yntema C L. A series of stages in the embryonic development of *Chelydra serpentina*. *Journal of Morphology*, 1968, **125**: 219~252.
- [8] Greenbaum E. A standardized series of embryonic stages for the emydid turtle *Trachemys scripta*. *Canadian Journal of Zoology*, 2002, **80**: 1 350~1 370.
- [9] Pieau C. Modalities of the action of temperature on sexual differentiation in field developing embryos of the European pond turtle *Emysorbicularis* (Emyidae). *The Journal of Experimental Zoology*, 1982, **220**: 353~360.
- [10] Ewert M A, Nelson C E. Sex determination in turtles: patterns and some possible adaptive values. *Copeia*, 1991, **1**: 50~69.
- [11] 朱新平, 陈永乐, 魏成清. 温度对黄喉拟水龟性别决定的影响. *生态学报*, 2006, **26**(2): 620~625.
- [12] Mrosovsky S R, Hopkins M, Richardson J I. Sex ratio of sea turtles; seasonal changes. *Science*, 1984, **225**: 739~741.
- [13] Rauschenberger R H, Trauth S E, Farris J L. Incubation of alligator snapping turtle (*Macrochelys temminckii*) eggs in natural and agricultural soils. *Applied Herpetology*, 2004, **1**: 299~309.
- [14] Shyril O S. Embryonic temperature influences juvenile temperature choice and growth rate in rate in Snapping turtles. *Chelydra serpentina*. *Journal of Experimental Biology*, 1998, **201**: 439~449.
- [15] Desvages G, Girondot M, Pieau C. Sensitive stages for the effects of temperature on gonadal aromatase activity in embryos of the marine turtle *Dermochelys coriacea*. *General and Comparative Endocrinology*, 1993, **92**: 54~61.
- [16] Bull J J, Vogt R C. Temperature-dependent sex determination in Turtles. *Science*, 1979, **206**: 1 186~1 188.
- [17] Delmas V, Prevot-Julliard A C, Pieau C. A mechanistic model of temperature-dependent sex determination in a chelonian: the European pond turtle. *Functional Ecology*, 2008, **22**: 84~93.
- [18] Packard G C, Packard M J. The physiological ecology of reptilian eggs and embryos. *Biology of the Reptilia*, 1988, **16**: 523~605.
- [19] Jeyasuria P, Roosenburg W M, Place A R. Role of P-450 aromase in sex determination of the diamondback terrapin. *Malaclemys terrapin*. *Journal of Experimental Zoology*, 1994, **270**: 95~111.
- [20] Ewert M A, Ronnie E, Hatcher J, et al. Sex determination and ontogeny in *Malacochersus tornieri*, the pancake tortoise. *Journal of Herpetology*, 2004, **38**: 291~295.
- [21] Janzen F J. The influence of incubation temperature and family on eggs, embryos, and hatchlings of the smooth softshell turtle (*Apalone mutica*). *Physiological Zoology*, 1993, **66**: 349~373.
- [22] Choo B L, Chou L M. Does incubation temperature influence the sex of embryos in *Trionyx sinensis*. *Herpetology*, 1985, **26** (3): 341~342.
- [23] 朱道玉, 孙西寨. 中华鳖的性别决定. *动物学杂志*, 2000, **35**(6): 37~38.
- [24] 聂刘旺, 郭超文, 汪鸣等. 中华鳖的性别决定机制. *应用与环境生物学报*, 2001, **7**(3): 258~261.
- [25] Dodd K L, Wibbels T. Estrogen inhibits caudal progression but stimulates proliferation of developing Müllerian ducts in a turtle with temperature-dependent sex determination. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 2008, **150**: 315~319.
- [26] Ramsey M, Crews D. Steroid signaling and temperature-dependent sex determination-reviewing the evidence for early action of estrogen during ovarian determination in turtles. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2009, **20**(3): 283~292.
- [27] Pieau C. Temperature sensitive of sexual differentiation of gonads in the European pond turtle; hormonal involvement. *The Journal of Experimental Zoology*, 1995, **270**: 86~94.
- [28] Pieau C, Dorizzi M, Richard M N. Temperature-dependent sex determination and gonadal differentiation in reptile. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1999, **55**: 887~900.
- [29] Willingham E, Baldwin R, Skipper J K, et al. Aromatase activity during embryogenesis in the brain and adrenal kidney

- gonad of the red-eared slider turtle, a species with temperature-dependent sex determination. *General and Comparative Endocrinology*, 2000, **119**: 202~207.
- [30] Jeyasula P. Embryonic brain-gonadal axis in temperature-dependent sex determination of reptile: a role for P450 aromatase (CYP19). *The Journal of Experimental Zoology*, 1998, **281**: 428~449.
- [31] Eitberger C R, Ewert M A, Phillips J B. Carbon dioxide influences environmental sex determination in two species of turtles. *Amphibia-Reptilia*, 2002, **23**: 169~175.
- [32] Fleming A, Crews D. Estradiol and incubation temperature modulate regulation of steroidogenic factor 1 in the developing gonad of the red-eared slider turtle. *Endocrinology*, 2001, **142**: 1 403~1 411.
- [33] Ramsey M, Shoemaker C, Crews D. Gonadal expression of Sf1 and aromatase during sex determination in the red-eared slider turtle (*Trachemys scripta*), a reptile with temperature-dependent sex determination. *Differentiation*, 2007, **75**: 978~991.
- [34] Parker K L, Rice D A, Lala D S. Steroidogenic factor 1: an essential mediator of endocrine development. *Recent Progress in Hormone Research*, 2002, **57**: 19~36.
- [35] Valenzuela N, LeClere A, Shikano T. Comparative gene expression of steroidogenic factor 1 in *Chrysemys picta* and *Apalone mutica* turtles with temperature-dependent and genotypic sex determination. *Evolution and Development*, 2006, **8**: 424~432.
- [36] Wibbels T, Cowan J, Leboeuf R. Temperature-dependent sex determination in the red-eared slider turtle, *Trachemys scripta*. *The Journal of Experimental Zoology*, 1998, **281**: 409~416.
- [37] Takada S, DiNapoli L, Capel B, *et al.* *Sox8* is expressed at similar levels in gonads of both sexes during the sex determining period in turtles. *Developmental Dynamics*, 2004, **231**: 387~395.
- [38] Maldonado L C T, Piedra A L, Moreno-Mendoza N. Expression profiles of *Dax1*, *Dmrt1*, and *Sox9* during temperature sex determination in gonads of the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *General and Comparative Endocrinology*, 2002, **129**: 20~26.
- [39] Rhen T, Metzger K, Schroeder A, *et al.* Expression of putative sexdetermining genes during the themosensitive period of gonad development in the snapping turtle, *Chelydra serpentina*. *Sexual Development*, 2007, **1**: 255~270.
- [40] Shoemaker C M, Ramsey M, Queen J, *et al.* Expression of *Sox9*, *Mis*, and *Dmrt1* in the gonad of a species with temperature-dependent sex determination. *Developmental Dynamics*, 2007, **236**: 1 055~1 063.
- [41] Spotila L D, Spotila J R, Hall S E. Sequence and expression analysis of *WT1* and *Sox9* in the red-eared slider turtle, *Trachemys scripta*. *The Journal of Experimental Zoology*, 1998, **284**: 417~427.
- [42] Schmahl J, Yao H H, Pierucci-Alves F, *et al.* Colocalization of *WT1* and cell proliferation reveals conserved mechanisms in temperature-dependent sex determination. *Genesis*, 2003, **35**: 193~201.
- [43] Valenzuela N. Relic themosensitive gene expression in a turtle with genotypic sex determination. *Evolution* 2008, **62**: 234~240.
- [44] Kettlewell J R, Raymond C S, Zarkower D. Temperature-dependent expression of turtle *Dmrt1* prior to sexual differentiation. *Genesis*, 2000, **26**: 174~178.
- [45] Murdock C, Wibbels T. Expression of *Dmrt1* in a turtle with temperature-dependent sex determination. *Cytogenetic and Genome Research*, 2003, **101**: 302~308.
- [46] Murdock C, Wibbels T. *Dmrt1* expression in response to estrogen treatment in a reptile with temperature-dependent sex determination. *The Journal of Experimental Zoology Part B*, 2006, **306**: 134~139.
- [47] Burke R L. Adaptive value of sex determination mode and hatching sex-ratio bias in reptiles. *Copeia*, 1993, **3**: 854~859.
- [48] Janzen F J, Paukstis G L. A preliminary test of the adaptive significance of environmental sex determination in reptiles. *Evolution*, 1991, **45**: 435~440.
- [49] Birchard G F, Packard M J, Packard G C. Effect of temperature and hydric conditions on blood pH in embryonic snapping turtles (*Chelydra serpentina*). *Canadian Journal of Zoology*, 1990, **68**: 190~193.