

# 雞隻性別決定機制概論<sup>(1)</sup>

郭曉芸<sup>(2)(4)</sup> 張以恆<sup>(3)</sup>

收件日期：109 年 5 月 4 日；接受日期：109 年 8 月 3 日

## 摘 要

家禽產業的經營是具有單性別偏好，然而雞之遺傳性別決定系統屬於雌性異基因型組合 (heterozygous system)，無法利用雄性精子篩選的方式達到選性繁殖目的。雞為鳥禽，在演化上介於爬蟲類與哺乳類之間，然而在性別調控上，不具有爬蟲類依環境溫度控制性別的基因表現路徑，染色體上亦無哺乳類動物調控性別的 SRY (sex-determining region of Y chromosome) 基因。越來越多研究指出，鳥類可能具有獨特的性別決定或分化路徑，而其性別決定機制眾說紛紜尚無定論。目前鳥類性別決定之主要假說計有：Z 染色體劑量、W 染色體或雌性相關主導基因及細胞自主作用等，其中並無任一項足可完整解釋鳥類性別決定與分化路徑，但是可以推測每個假說機轉之間相互關聯。雞隻性別形成過程，除在轉錄體層級研究外，表觀遺傳調控 (epigenetic regulation) 亦參與其中，未來可以利用更精確基因編輯 (gene editing) 技術進行更深入的研究探討，以突破目前性別決定與分化理論的瓶頸。

關鍵詞：雞、雌性異配子體系統、性別決定機制。

## 緒 言

雞隻在人類蛋白質供應及疾病動物模式研究上均具有顯著貢獻。畜牧產業中，雞隻供應人類肉與蛋兩大蛋白質食物來源 (Doran *et al.*, 2016)。但這兩種產業生產者對於雞隻性別偏好不同，尤其在雞蛋供應產業上偏好雌性雞隻極為顯著，雄性雞隻的淘汰造成動物福祉與生產成本的問題 (Doran *et al.*, 2018)。如能建立生產單一性別或具提早辨識性別的技術，對家禽產業極有助益。雞隻具有生醫研究應用價值，因為具有較短的生產間隔、生殖細胞易於操作，並且與人類在生理上有部分相似獨特性特質，在發生生物學、幹細胞生物學、毒性測試及人類疾病 (Burt, 2007; Tolosa *et al.*, 2013; Ozgural *et al.*, 2019; Vilches-Moure, 2019) 等研究範疇上，均為有價值的實驗動物模式。如能識明不同性別雞隻對疾病的表現差異，對作為人類疾病模式的參考度將可大幅提高。無論是在畜產應用或生醫研究，雞隻性別辨識與表現差異均為首要技術，而調節孵化雞隻的性別取決於對性別決定機制和性別發育系統之瞭解 (Hirst *et al.*, 2018)，在探究選性原理及性別差異調控因子前，需先確知雞隻性別決定和分化調控基因路徑。本篇專題論著將概述脊椎動物性別決定、鳥類 (雞) 染色體系統與性別決定之主要假說 (表 1)。

## 脊椎動物性別決定與雞性染色體系統

先前研究者認為羊膜脊椎動物的性別均為基因型決定，後來在蜥蜴研究上發現環境孵化溫度與性別比例之間的相關。爬蟲類動物在受精時無法從親代得到性別基因型，這些物種缺乏明顯的異型性染色體 (Dorizzi *et al.*, 1996)，也無法確認性腺的性別。孵化溫度為爬蟲類睪丸發育並抑制卵巢發育或往相反路徑的決定點，以紅耳龜 (*Trachemys scripta*) 為例，孵化溫度為 26°C 時孵化為雄性，孵化溫度為 31°C 為雌性，孵化溫度 29.2°C 則產生大約 1:1 的性別比例 (Crews *et al.*, 1994)。以溫度決定性別的物種會受孵化溫度與持續時間影響，性腺分化早期溫度效應為可逆且可以累積，性別器官發育具有全有全無的特徵 (Crews *et al.*, 1994)。在鳥類與哺乳類動物則沒有上述的溫度決定性別的特徵，而是以具穩定的性染色體同型與異型配子形式，性別比例約為 1:1，符合基因型性別決定模式，即由受精時

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2646 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所生理組。

(3) 行政院農業委員會畜產試驗所技術服務組。

(4) 通訊作者，E-mail: hykuo@tlri.gov.tw。

短暫時間內染色體遺傳決定後代性別，但鳥類與哺乳類兩者的染色體系統並不相同 (Wilhelm *et al.*, 2007; Major and Smith, 2016)。

表 1. 雞隻性別決定假說摘要

Table 1. Summary of chicken sex determination hypotheses

Hypothesis	Related genes or DNA region	Observation	Reference
(i) Z chromosome dosage compensation	DMRT1	Over-expression results in masculinization of female gonads	Lambert <i>et al.</i> , 2014
	DMRT1	Knockdown results in feminization of male gonads	Smith <i>et al.</i> , 2009
	MHM	Over-expression results in a decline expression of male related genes	Roeszler <i>et al.</i> , 2012
	MHM	Hypermethylation results in an addition expression of male related genes	Itoh <i>et al.</i> , 2011; Rastetter <i>et al.</i> , 2015
(ii) W chromosome or female related dominant genes	HINTW	Highly correlated with ovarian development, may be a candidate gene for female sex determination or a negative regulator of male development	Brenner, 2002; Smith <i>et al.</i> , 2007; Ayers <i>et al.</i> , 2013
	CYP19A1 (aromatase)	Inhibitor results in partial feminization of male gonads	Elbrecht and Smith, 1992
	CYP19A1 (aromatase)	Over-expression results in feminization of male gonads	Vaillant <i>et al.</i> , 2001; Lambeth <i>et al.</i> , 2013
(iii) Cell autonomous	Sex-dimorphic expression genes	Sexual differentiation of some somatic phenotypes cannot be explained by the actions of gonadal steroids	Arnold <i>et al.</i> , 1997
	Sex-dimorphic expression genes	Avian somatic cells possess an inherent sex identity which is cell autonomous	Zhao <i>et al.</i> , 2010

鳥類在演化上比哺乳類更早出現，其性染色體系統為 Z 和 W，不同於哺乳動物的 X 和 Y 染色體系統，兩個物種的性染色體是從不同的體染色體進化而來 (Grave, 2014)。鳥類屬於雌性異型合子系統，母禽性染色體為 ZW，公禽性染色體為 ZZ。以雞為例，其 Z 染色體大小約 82.3 Mb，包含 884 個具蛋白質編碼序列的基因和 348 個非編碼序列基因，如 microRNA 與 lncRNA (Handley *et al.*, 2004)，但多數為與性別無關的管家基因 (housekeeping gene) (Bellott *et al.*, 2010)。在演化上 Z 染色體偏向於保留雄性優勢、性別與繁殖相關的基因 (Mank and Ellegren, 2009; Wright *et al.*, 2012)。W 染色體在演化上可視為 Z 染色體的退化副本 (Mank and Ellegren, 2007; Ayers *et al.*, 2013; Bellott *et al.*, 2017)，在性別決定機制上的證據較無 Z 染色體豐富 (Hirst *et al.*, 2018)，從 W 染色體長度及所含基因數上可見一斑。雞的 W 染色體大小為 Z 染色體的 6%，約 7 Mb，約有 25 至 28 個蛋白質編碼基因和 116 個非編碼 RNA (Bellott *et al.*, 2017) 存在於小部分的偽體染色體區，70% 區域含有 XhoI、EcoRI 和 SspI 類的重複序列 (Saitoh and Mizuno, 1992)，W 染色體上大部分為緊密摺疊的異染色質，轉錄活性很低，極少參與基因表現 (Fridolfsson *et al.*, 1998; Mank and Ellegren, 2007)。

## 鳥禽性別決定假說

### (i) Z 染色體劑量決定 (Z chromosome dosage compensation)

Z 染色體劑量補償為鳥禽性別決定假說之一，Z 染色體基因劑量補償屬於非全面性的，不同於哺乳動物 X 染色體失活的全體性染色體劑量補償系統 (Ellegren *et al.*, 2007; Arnold *et al.*, 2008; Itoh *et al.*, 2011)。X 染色體的劑量補償是指具有 XX 同型合子的雌性，其中一條 X 染色體失去活性的現象，劑量補償效應使雌性與只有一條 X 染色體的雄性基因表現量一致。然而在雄性 ZZ 的染色體上，卻沒有完全遵循劑量補償原則，僅部分 Z 染色體失去活性。非全面性的劑量補償表示 Z 染色體上的某些基因於雌 (ZW)、雄 (ZZ) 之間表現量不均等，雄性 Z 染色體部分基因表現量可為雌性的 1.5 至 2 倍。這個特性有可能造成體內不同組織的性別決定與性別發育的差異 (Zhang *et al.*, 2010; Wright *et al.*, 2012; Ayers *et al.*, 2013)，而這些沒有遵守劑量補償原則的基因，有可能是性別決

定的候選基因 (Hirst *et al.*, 2018)。比較雞隻 Z 染色體與 W 染色體上同源基因於雌、雄個體內的基因劑量總表現，可以再排除總劑量相似的基因，將性別決定候選基因的範圍更為縮小 (Bellott *et al.*, 2017; Hirst *et al.*, 2018)。其中包含於發育睪丸中表現的 DMRT1 (Doublesex and Mab-3 transcription factor 1) 基因和影響 DMRT1 表現的 MHM (male hypermethylated) 區域。

DMRT1 在脊椎動物為保守序列 (conserved sequence)，是一種 Zinc finger 轉錄因子，具保守性的 DNA 結合位置 (DNA-binding motif)，稱為 DM domain。雞之 DMRT1 基因位於 Z 染色體上，在生殖細胞和體細胞中都有表現，但在雄性性腺中表現量明顯較其他組織為高 (Omotehara *et al.*, 2014)。許多證據都支持 DMRT1 是鳥禽之 Z 染色體劑量性別決定因素的假說，且可確認其為雄鳥性器官發育不可或缺的基因之一。在雞雄性胚胎的基因剔除與 RNA 干擾研究中，如抑制 DMRT1 基因表現，左側性腺會出現雌性特異組織特徵、雌性特異基因 CYP19A1 表現上升、雄性睪丸索 (testis cord) 形成紊亂、雄性睪丸發育特異基因 SOX9 基因表現下降等現象，也就是雄性性腺在型態結構和基因表現上雌性化 (Smith *et al.*, 2009)，也增加 DMRT1 在雞隻睪丸發育中為必要因子的證據。同時，於雌性性腺中引入外源性 DMRT1 基因，使得 DMRT1 表現量較正常雌性性腺更為增加，造成雌性性腺特異型態皮質發育延遲，雄性化的睪丸索組織型態出現。在形態分化前也可觀察到與哺乳動物 SRY 基因相關的 SOX9 基因在雞隻雌性胚胎中有局部明顯的表現，並且會誘導雄性 Z 染色體連鎖基因 HEMGN 表現以及降低雌性特異基因 CYP19A1 的表現 (Lambeth *et al.*, 2014)。這些結果均可表明 DMRT1 在雄性和雌性中缺乏完全的劑量補償效應，而使其在雌、雄個體上具有劑量差異，造成不同路徑的性腺分化、基因表現及後續性別發育。

另一個在 Z 染色體上值得注意的 DNA 區域為 2.2 kb 的 MHM 區域，在染色體上的位置與 DMRT1 基因相鄰。MHM 區域轉錄出的非編碼 RNA 為 DMRT1 的抑制物，在雌性雞隻 Z 染色體上，MHM 區域的附近為補償作用基因，具高度 H4K16 位點之組蛋白乙醯化，推測 MHM 可能在局部劑量補償效應中發揮功用，並具有顯著的低度甲基化，使得雌性雞隻中和 MHM 相鄰的基因表現提高至與雄性雞隻表現量相似或更高 (Bisoni *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2019)。雌性雞隻 MHM 區域的 DNA 可轉錄成長非編碼 RNA，結合於 DMRT1 基因上而抑制了部分 DMRT1 生成 (Teranishi *et al.*, 2001)，造成雌性雞隻 DMRT1 基因表現較雄性雞隻低，而不致誘發雄性性腺發育路徑。低度甲基化的區域通常與調節訊號、啟動子或增強子等有關 (Elango and Yi, 2008)，也可推測雌性雞隻 MHM 低甲基化的特性，可能與調節雌性特異表現或功能高度相關 (Sun *et al.*, 2019)。在雞隻雄性 Z 染色體上，MHM 區域 DNA 呈現甲基化 (Sun *et al.*, 2019)，降低了 MHM 區域非編碼 RNA 的生成，而減少了 DMRT1 基因表現的抑制，使得雄性的兩條 Z 染色體均有 DMRT1 表現，雖然兩條 Z 染色體之 MHM 區域甲基化程度不盡相同 (Itoh *et al.*, 2011)，但仍會促使下游的 SOX9、AMH 及 HEMGN 等雄性特異基因表現，同時抑制 FOXL2、CYP19A1、 $\beta$ -catenin 等雌性分化相關基因，使得性腺分化朝向雄性發育路徑 (Rastetter *et al.*, 2015)。與哺乳類動物的 XIST 相似 (Briggs and Reijo Pera, 2014)，MHM 區域在性腺性別分化中具關連性 (Teranishi *et al.*, 2001; Roeszler *et al.*, 2012; Caetano *et al.*, 2014)，MHM 的全面性過表現會使兩種性別的雞胚胎均發育異常，並且會顯著降低性腺上 DMRT1 表現 (Roeszler *et al.*, 2012)。鳥類之 Z 染色體基因劑量效應影響性別發育雖有其原理，但劑量閥值與其他控制基因的關係為何，都是需要後續研究與探討的議題。

## (ii) W 染色體關鍵基因與雌性相關基因 (W chromosome or female related dominant genes)

大多數 W 染色體上的基因為劑量敏感，需與 Z 染色體上的同源基因有相似劑量的基因表現而被保留下來，這些基因通常與轉錄、轉譯、蛋白質降解及訊號傳遞相關 (Bellott *et al.*, 2017)。這些基因遵守了劑量補償原則，在雌、雄鳥體內劑量總體表現上較無差異，理論上不會被視為性別決定的候選基因 (Hirst *et al.*, 2018)。值得注意的是 W 染色體上的 HINTW 基因 (W-chromosome HINT gene)，雖然與 Z 染色體上的同源基因 HINT1 (histidine triad nucleotide-binding protein 1) 同為 HIT (histidine triad) 家族，但序列明顯不同，缺乏 HINT 下游酵素活性結構域 (domain) (Brenner, 2002; Parks *et al.*, 2004; Moriyama *et al.*, 2006)。在孵化初期至性腺分化前，即可在雌性胚胎內偵測到大量 HINTW 表現 (Zhang *et al.*, 2010)，且其基因表現遍布雞胚胎各組織 (O'Neill *et al.*, 2000)。HINTW 通過異源二聚化 (heterodimerization) 干擾 HINT 功能 (Pace and Brenner, 2003)，推測與卵巢發育呈現高度相關，並可能是雌性性別決定候選因子或為雄性發育的負向調控因子 (Pace and Brenner, 2003; Moghadam *et al.*, 2012; Ayers *et al.*, 2013; Bellott *et al.*, 2017)。

HINTW 與 DMRT1 相同，都在性腺開始分化前就已可測得基因表現，而為鳥類性別決定候選因子之一。但除了在性腺中表現，HINTW 也在胚胎時期泄殖系統外的組織中廣泛表現，提供了性別可以透過遺傳及激素決定外，推測也能影響其他組織的分化 (Smith *et al.*, 2007)。雌鳥在低劑量 DMRT1 表現下性腺分化為卵巢，但是否全由 Z 染色體決定，或為 W 染色體上的基因參與了 Z 染色體甲基化表現而促進了卵巢發育，則需要更多證據予



以證實 (Teranishi *et al.*, 2001)。以哺乳類動物分析染色體非整倍體之個體後，發現了 SRY 基因對哺乳類動物性別決定之重要性，然目前雞隻研究中，染色體非整倍體的發生率極低或具有高度致死性 (Graves, 2003)，均使得研究者無法獲得足夠的非整倍體個體，造成無法更快速而進一步瞭解雞性別決定樣貌。

另一個與雌性特異性有關的基因 CYP19A1，下游所製造的芳香酶 (aromatase)，此種含細胞色素 P450 的酵素能將雄性激素轉化為雌性激素。此基因於性腺分化開始時，僅在雌性性腺中能測得表現，可推測為影響後續卵巢分化發育的因子 (Elbrecht and Smith, 1992; Vaillant *et al.*, 2001)。雞胚胎早期如以 Fadrozole 等環化酵素抑制劑來抑制芳香酶的表現，會導致雌性性腺部分雄性化，形成雄性的雙側睪丸和外部表型 (Elbrecht and Smith, 1992; Vaillant *et al.*, 2001)，這結果與早期觀察到的雄性雞隻有著雌性雞隻羽毛的研究相同，後者為芳香酶基因變異造成 (George *et al.*, 1990; McPhaul *et al.*, 1991)。另外，雄性雞胚胎時期給予外源性芳香酶，亦可使雄性胚胎左性腺外部皮層增厚、髓質增厚伴有腔隙並發育成卵巢組織，右性腺退化，DMRT1 和 SOX9 等雄性基因表現下降，FOXL2 和 RSPO1 等雌性基因表現上升等雌性化特徵 (Lambeth *et al.*, 2013)。另外值得注意的是，當受到外源因素干擾時，性腺的表型或基因表現受影響，而與原遺傳性別不一致 (雄性性腺雌性化或相反)，但在表觀遺傳調控上傾向與原遺傳決定的性別一致，例如在 ZZ 雄性雞胚胎性腺雌性化實驗中，在上述的表型與基因表現均雌性化的情形下，CYP19A1 啟動子於外源性刺激引起 DNA 甲基化和組蛋白離胺酸甲基化時，仍保有部分雄性化的特徵 (Ellis *et al.*, 2012)，這對永久性的性別逆轉研究上提供一個可行的研究方向。

### (iii) 細胞自主 (cell autonomous)

1970 年代所認知的鳥類之性別決定機制與其他脊椎動物相同 (Jost *et al.*, 1973)，當時認為是由性染色體上的基因表現誘導二態性的胚胎性腺 (dimorphic embryonic gonads) 分化成卵巢或睪丸，同時分泌激素使動物體其他部位的發育是與性腺相同的性別特徵。許多物種性腺分化為睪丸或卵巢之前，胚胎發育中的基因表現為性別二態性 (Renfree and Short, 1988; Dewing *et al.*, 2003; Bermejo-Alvarez *et al.*, 2010)。Arnold *et al.* (1997) 率先提出於鳥類中性別差異發育具有直接性的細胞自主作用，而激素為間接關係，甚至兩性別性腺差異可視為性別分化表型的其中之一 (Hirst *et al.*, 2018)。而雞胚胎性腺分化前，已可測得雌雄特異的基因表現，但此時性腺尚未分化，更無性激素產生 (O'Neill *et al.*, 2000; Scholz *et al.*, 2006)，這結果支持了細胞自主作用原理。2010 年 Zhao 等人提供了分子和胚胎學證據，表示胚胎性別決定早於性腺發育，而實際上可能是細胞自主作用，更給了這個現象一個名詞，提出細胞自主性別認同 (cell autonomous sex identity, CASI) 假說。CASI 是從觀察三隻罕見的雌雄同體雞隻開始，這些雞隻一側身體為雞冠、肉垂、尾羽、胸肌發達之公雞表型，另側身體為雞冠、肉垂、胸肌較小之母雞表型，且從公雞表型端取得的細胞性染色體為 ZZ，但從母雞表型端取得的細胞性染色體則非完全為 ZW 基因型 (Zhao *et al.*, 2010)，顯示雌雄同體外表型不是因為性激素參與差異所引起，而且外表型與性腺性別並不相對應。

同時，在異性胚胎嵌合體研究上也可推斷出相同結論。將性腺分化前的雌性性腺中胚層組織移植到雄性性腺組織上，另一方面也將性腺分化前的雄性性腺中胚層組織移植到雌性性腺組織上，性腺分化成為原先移植組織性別，而非移入宿主性別 (Zhang *et al.*, 2010)。分析胚胎發育第 3.5 天雄性和雌性胚胎中基因表現，發現在性腺形成或性別分化之前，許多基因表現有具雄性或雌性偏向，且這樣的性別表現差異基因，大多來自於 Z 染色體連鎖基因 (Zhang *et al.*, 2010)，這種 Z 基因劑量不平衡，在性腺性別分化為卵巢或睪丸之前就出現 (Ellegren *et al.*, 2007)，亦為支持細胞自主性發育提供了有力證據 (Hirst *et al.*, 2018)。這些研究結果均顯示鳥禽細胞具有先天性別表型潛力，且涉及直接的遺傳效應，也就是細胞自主性發育 (Zhao *et al.*, 2010)，將傳統基因表現導致性腺分化及激素分泌，使身體發育與性腺性別相同的特徵之因果關係做了修正。

## 結 論

雞為鳥禽，在演化上介於爬蟲動物和哺乳動物之間，保留兩者部分特徵，不但具有兩者之遺傳要素，對激素的感受也極為敏感，是適合研究脊椎動物性別決定、分化和演化的動物模式。鳥類性別決定機制尚未定論，主要的假說為 Z 染色體連鎖基因劑量使得雄性雞隻分化、W 染色體基因主導雌性雞隻分化，以及個體細胞自主作用。這些假說之間也許並非單獨存在，而是有極高的機率各自對鳥類性別決定機制有一定程度貢獻且互相關聯。鳥類性腺的分化分子途徑，在雄性可藉由綜觀雄性特異基因 DMRT1、SOX9、PGDS 和 AMH 的表現或活性，以及雌性特異基因 FOXL2、CYP19A1 和 RSPO1 / WNT4 等上、下游路徑之關聯得窺一二。未來更可利用日益精進發展的技術，針對候選基因調控路徑精準分析，以更完整雞隻性別相關機制的全貌。

## 未來研究方向

基因功能性及相關基因劑量研究目前普遍利用 RCAS 病毒 (Lambeth *et al.*, 2013; Lambeth *et al.*, 2014) 或電穿孔技術 (Ayers *et al.*, 2015; Hirst *et al.*, 2017) 進行雞隻胚胎基因表現抑制或外源表現等試驗，但 in-ovo CRISPR / Cas9 方式的介導的基因編輯技術是目前發展最快速的技術 (Morin *et al.*, 2017; Chojnacka-Puchta and Sawicka, 2020)，可更精確地進行基因剔除與插入等研究。這些基因抑制、剔除或過表現的技術用於轉錄體和表觀遺傳等基因組分析，將可對鳥類性別決定和性腺分化的主要調控路徑有更深入的了解。性別決定機制與關鍵基因對於性腺發育初期至為重要，後續相關分化基因及成年後維持性別表型基因，在性別維持上扮演舉足輕重的角色，為未來相關研究重點項目。

## 參考文獻

- Arnold, A. P. 1997. Sexual differentiation of the zebra finch song system: positive evidence, negative evidence, null hypotheses and a paradigm shift. *J. Neurobiol.* 33: 572-584.
- Arnold, A. P., Y. Itoh and E. Melamed. 2008. A bird's-eye view of sex chromosome dosage compensation. *Annu. Rev. Genome Hum. Genet.* 9: 109-127.
- Ayers, K. L., A. D. Cutting, K. N. Roeszler, A. H. Sinclair and C. A. Smith. 2015. DMRT1 is required for Mullerian duct formation in the chicken embryo. *Dev. Biol.* 400: 224-236.
- Ayers, K. L., C. A. Smith and L. S. Lambeth. 2013. The molecular genetics of avian sex determination and its manipulation. *Genesis* 51: 325-336.
- Bannister, S. C., C. A. Smith, K. N. Roeszler, T. J. Doran, A. H. Sinclair and M. L. Tizard. 2011. Manipulation of estrogen synthesis alters MIR202\* expression in embryonic chicken gonads. *Biol. Reprod.* 85: 22-30.
- Bellott, D. W., H. Skaletsky, T. J. Cho, L. Brown, D. Locke, N. Chen, S. Galkina, T. Pyntikova, N. Koutseva, T. Graves, C. Kremitzki, W. C. Warren, A. G. Clark, E. Gaginskaya, R. K. Wilson and D. C. Page. 2017. Avian W and mammalian Y chromosomes convergently retained dosage-sensitive regulators. *Nat. Genet.* 49: 387-394.
- Bellott, D. W., H. Skaletsky, T. Pyntikova, E. R. Mardis, T. Graves, C. Kremitzki, L. G. Brown, S. Rozen, W. C. Warren, R. K. Wilson and D. C. Page. 2010. Convergent evolution of chicken Z and human X chromosomes by expansion and gene acquisition. *Nature* 466: 612-616.
- Bermejo-Alvarez, P., D. Rizos, D. Rath, P. Lonergan and A. Gutierrez-Adan. 2010. Sex determines the expression level of one third of the actively expressed genes in bovine blastocysts. *PNAS* 107: 3394-3399.
- Bisoni, L., L. Batlle-Morera, A. P. Bird, M. Suzuki and H. A. McQueen. 2005. Female-specific hyperacetylation of histone H4 in the chicken Z chromosome. *Chromosome Res.* 13: 205-214.
- Brenner, C. 2002. Hint, Fhit and GalT: function, structure, evolution and mechanism of three branches of the histidine triad superfamily of nucleotide hydrolases and transferases. *Biochemistry* 41: 9003-9014.
- Briggs, S. F. and R. A. Reijo Pera. 2014. X chromosome inactivation: recent advances and a look forward. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 28: 78-82.
- Burt, D. W. 2007. Emergence of the chicken as a model organism: implications for agriculture and biology. *Poult. Sci.* 86: 1460-1471.
- Caetano, L. C., F. G. Gennaro, K. Coelho, F. M. Araujo, R. A. Vila, A. Araujo, A. de Melo Bernardo, C. R. Marcondes, S. M. Chuva de Sousa Lopes and E. S. Ramos. 2014. Differential expression of the MHM region and of sex-determining-related genes during gonadal development in chicken embryos. *Genet. Mol. Res.* 13: 838-849.
- Chojnacka-Puchta, L. and D. Sawicka. 2020. CRISPR/Cas9 gene editing in a chicken model: current approaches and applications. *J. Appl. Genet.* 61: 221-229.
- Crews, D., J. Bergeron, J. Bull, D. Flores, A. Tousignant, J. Skipper and T. Wibbels. 1994. Temperature-dependent sex determination in reptiles: Proximate mechanisms, ultimate outcomes and practical applications. *Dev. Genet.* 15: 297-312.
- Dewing, P., T. Shi, S. Horvath and E. Vilain. 2003. Sexually dimorphic gene expression in mouse brain precedes gonadal differentiation. *Mol. Brain Res.* 118: 82-90.

- Doran, T. J., C. A. Cooper, K. A. Jenkins and M. L. Tizard. 2016. Advances in genetic engineering of the avian genome: "Realising the promise". *Transgenic Res.* 25: 307-319.
- Doran, T. J., K. R. Morris, T. G. Wise, T. E. O'Neil, C. A. Cooper, K. A. Jenkins and M. L. V. Tizard. 2018. Sex selection in layer chickens. *Anim. Prod. Sci.* 58: 476-480.
- Dorizzi, M., N. Richard-Mercier and C. Pieau. 1996. The ovary retains male potential after the thermosensitive period for sex determination in the turtle *Emys orbicularis*. *Differentiation* 60: 193-201.
- Elango, N. and S. V. Yi. 2008. DNA Methylation and Structural and Functional Bimodality of Vertebrate Promoters. *Mol. Biol. Evol.* 25: 1602-1608.
- Elbrecht, A. and R. G. Smith. 1992. Aromatase enzyme activity and sex determination in chickens. *Science* 255: 467-470.
- Ellegren, H., L. Hultin-Rosenberg, B. Brunstrom, L. Dencker, K. Kultima and B. Scholz. 2007. Faced with inequality: chicken do not have a general dosage compensation of sex-linked genes. *BMC Biol.* 5: 40.
- Ellis, H. L., K. Shioda, N. F. Rosenthal, K. R. Coser and T. Shioda. 2012. Masculine epigenetic sex marks of the CYP19A1/aromatase promoter in genetically male chicken embryonic gonads are resistant to estrogen-induced phenotypic sex conversion. *Biol. Reprod.* 87: 23, 1-12.
- Fridolfsson, A. K., H. Cheng, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, H. C. Liu, T. Raudsepp, T. Woodage, B. Chowdhary, J. Halverson and H. Ellegren. 1998. Evolution of the avian sex chromosomes from an ancestral pair of autosomes. *PNAS* 95: 8147-8152.
- George, F. W., H. Matsumine, M. J. McPhaul, R. G. Somes, Jr. and J. D. Wilson. 1990. Inheritance of the henny feathering trait in the golden Campine chicken: evidence for allelism with the gene that causes henny feathering in the Sebright bantam. *J. Hered.* 81: 107-110.
- Graves, J. A. 2003. Sex and death in birds: a model of dosage compensation that predicts lethality of sex chromosome aneuploids. *Cytogenet. Genome Res.* 101: 278-282.
- Graves, J. A. 2014. Avian sex, sex chromosomes and dosage compensation in the age of genomics. *Chromosome Res.* 22: 45-57.
- Handley, L. J., H. Ceplitis and H. Ellegren. 2004. Evolutionary strata on the chicken Z chromosome: implications for sex chromosome evolution. *Genetics* 167: 367-376.
- Hirst, C. E., A. T. Major, K. L. Ayers, R. J. Brown, M. Mariette, T. B. Sackton and C. A. Smith. 2017. Sex reversal and comparative data undermine the W chromosome and support Z-linked DMRT1 as the regulator of gonadal sex differentiation in birds. *Endocrinology* 158: 2970-2987.
- Hirst, C. E., A. T. Major and C. A. Smith. 2018. Sex determination and gonadal sex differentiation in the chicken model. *Int. J. Plant Dev. Biol.* 62: 153-166.
- Itoh, Y., K. Kampf and A. P. Arnold. 2011. Possible differences in the two Z chromosomes in male chickens and evolution of MHM sequences in Galliformes. *Chromosoma* 120: 587-598.
- Jost, J. P., R. Keller and C. Dierks-Ventling. 1973. Deoxyribonucleic acid and ribonucleic acid synthesis during phosvitin induction by 17 $\beta$ -estradiol in immature chicks. *J. Biol. Chem.* 248: 5262-5266.
- Lambeth, L. S., D. M. Cummins, T. J. Doran, A. H. Sinclair and C. A. Smith. 2013. Overexpression of aromatase alone is sufficient for ovarian development in genetically male chicken embryos. *PLoSOne* 8: e68362.
- Lambeth, L. S., C. S. Raymond, K. N. Roeszler, A. Kuroiwa, T. Nakata, D. Zarkower and C. A. Smith. 2014. Over-expression of DMRT1 induces the male pathway in embryonic chicken gonads. *Dev. Biol.* 389: 160-172.
- Major, A. T. and C. A. Smith. 2016. Sex reversal in birds. *Sex. Dev.* 10: 288-300.
- Mank, J. E. and H. Ellegren. 2007. Parallel divergence and degradation of the avian W sex chromosome. *Trends Ecol. Evol.* 22: 389-391.
- Mank, J. E. and H. Ellegren. 2009. Sex-linkage of sexually antagonistic genes is predicted by female, but not male, effects in birds. *Evolution* 63: 1464-1472.
- McPhaul, M. J., H. Matsumine, M. A. Herbst and J. D. Wilson. 1991. Aromatase expression in extragonadal tissues of the Sebright chicken is controlled by a retroviral promoter. *Trans Assoc. Am. Phys.* 104: 141-149.
- Moghadam, H. K., M. A. Pointer, A. E. Wright, S. Berlin and J. E. Mank. 2012. W chromosome expression responds to female-specific selection. *PNAS* 109: 8207-8211.
- Morin, V., N. Veron and C. Marcelle. 2017. CRISPR/Cas9 in the chicken embryo. *Methods Mol. Biol.* 1650: 113-123.

- Moriyama, S., J. Ogiwara, J. Kato, T. Hori and S. Mizuno. 2006. 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.* 139: 91-97.
- Omotehara, T., C. A. Smith, Y. Mantani, Y. Kobayashi, A. Tatsumi, D. Nagahara, R. Hashimoto, T. Hirano, Y. Umemura, T. Yokoyama, H. Kitagawa and N. Hoshi. 2014. Spatiotemporal expression patterns of doublesex and mab-3 related transcription factor 1 in the chicken developing gonads and Mullerian ducts. *Poult. Sci.* 93: 953-958.
- O'Neill, M., M. Binder, C. Smith, J. Andrews, K. Reed, M. Smith, C. Millar, D. Lambert and A. Sinclair. 2000. ASW: a gene with conserved avian W-linkage and female specific expression in chick embryonic gonad. *Dev. Genes. Evol.* 210: 243-249.
- Ozgural, O., B. Bahadir, I. Dogan, U. Eroglu, S. Aktan, I. Kar, G. Cakici, E. Al-Beyati, G. Kahilogullari and A. Unlu. 2019. The effect of phenylamidol on neural development in early chicken embryo model. *Turk. Neurosurg.* 29: 851-855.
- Pace, H. C. and C. Brenner. 2003. Feminizing chicks: a model for avian sex determination based on titration of Hint enzyme activity and the predicted structure of an Asw-Hint heterodimer. *Genome Biol.* 4: R18.
- Parks, K. P., H. Seidle, N. Wright, J. B. Sperry, P. Bieganski, K. Howitz, D. L. Wright and C. Brenner. 2004. Altered specificity of Hint-W123Q supports a role for Hint inhibition by ASW in avian sex determination. *Physiol. Genomics* 20: 12-14.
- Rastetter, R. H., C. A. Smith and D. Wilhelm. 2015. The role of non-coding RNAs in male sex determination and differentiation. *Reproduction* 150: R93-107.
- Renfree, M. B. and R. V. Short. 1988. Sex determination in marsupials: evidence for a marsupial-eutherian dichotomy. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* 322: 41-53.
- Roeszler, K. N., C. Itman, A. H. Sinclair and C. A. Smith. 2012. The long non-coding RNA, MHM, plays a role in chicken embryonic development, including gonadogenesis. *Dev. Biol.* 366: 317-326.
- Saitoh, Y. and S. Mizuno. 1992. Distribution of XhoI and EcoRI family repetitive DNA sequences into separate domains in the chicken W chromosome. *Chromosoma* 101: 474-477.
- Scholz, B., K. Kultima, A. Mattsson, J. Axelsson, B. Brunstrom, K. Halldin, M. Stigson and L. Dencker. 2006. Sex-dependent gene expression in early brain development of chicken embryos. *BMC Neurosci.* 7: 12.
- Smith, C. A., K. N. Roeszler, Q. J. Hudson and A. H. Sinclair. 2007. Avian sex determination: what, when and where? *Cytogenet. Genome Res.* 117: 165-173.
- Smith, C. A., K. N. Roeszler, T. Ohnesorg, D. M. Cummins, P. G. Farlie, T. J. Doran and A. H. Sinclair. 2009. The avian Z-linked gene DMRT1 is required for male sex determination in the chicken. *Nature* 461: 267-271.
- Sun, D., D. L. Maney, T. S. Layman, P. Chatterjee and S. V. Yi. 2019. Regional epigenetic differentiation of the Z Chromosome between sexes in a female heterogametic system. *Genome Res.* 29: 1673-1684.
- Teranishi, M., Y. Shimada, T. Hori, O. Nakabayashi, T. Kikuchi, T. Macleod, R. Pym, B. Sheldon, I. Solovei, H. Macgregor and S. Mizuno. 2001. Transcripts of the MHM region on the chicken Z chromosome accumulate as non-coding RNA in the nucleus of female cells adjacent to the DMRT1 locus. *Chromosome Res.* 9: 147-165.
- Tolosa, A., X. Zhou, B. Spittau and K. Krieglstein. 2013. Establishment of a survival and toxic cellular model for Parkinson's disease from chicken mesencephalon. *Neurotox. Res.* 24: 119-129.
- Vaillant, S., S. Magre, M. Dorizzi, C. Pieau and N. Richard-Mercier. 2001. Expression of AMH, SF1 and SOX9 in gonads of genetic female chickens during sex reversal induced by an aromatase inhibitor. *Dev. Dynam.* 222: 228-237.
- Vilches-Moure, J. G. 2019. Embryonic chicken (*Gallus gallus domesticus*) as a model of cardiac biology and development. *Comp. Med.* 69: 184-203.
- Wilhelm, D., S. Palmer and P. Koopman. 2007. Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiol. Rev.* 87: 1-28.
- Wright, A. E., H. K. Moghadam and J. E. Mank. 2012. Trade-off between selection for dosage compensation and masculinization on the avian Z chromosome. *Genetics* 192:1433-1445.
- Zhang, S. O., S. Mathur, G. Hattem, O. Tassy and O. Pourquie. 2010. Sex-dimorphic gene expression and ineffective dosage compensation of Z-linked genes in gastrulating chicken embryos. *BMC genomics* 11: R13.
- Zhao, D., D. McBride, S. Nandi, H. A. McQueen, M. J. McGrew, P. M. Hocking, P. D. Lewis, H. M. Sang and M. Clinton. 2010. Somatic sex identity is cell autonomous in the chicken. *Nature* 464: 237-242.



# An overview on chicken sex determination mechanism <sup>(1)</sup>

Hsiao-Yun Kuo <sup>(2)(4)</sup> and I-Heng Chang <sup>(3)</sup>

Received: May 4, 2020; Accepted: Aug. 3, 2020

## Abstract

The challenge of poultry industry is the requirement of single sex preference which is not possible to adopt sperm selection technique due to the heterozygous system in females. Chicken belongs to avian birds and its evolutionary status of avian species is between reptiles and mammals; however, evidences showed that birds do not possess the temperature-dependent control for sex determination as that observed in reptiles or dominant SRY gene for sex determination in most mammals. An increasing number of studies suggest that the unique sex determination or differentiation system exists in bird's genetic mechanism, and the integrated sex determination mechanism still remains elusive inconclusive. 雞 The current sex determination mechanism hypotheses of birds are the Z chromosome dosage compensation, W chromosome or female related dominant gene and cell autonomous. There are still no definite mechanisms that can completely explain the sex determination and differentiation pathways of birds but it is generally assumed that these three mechanisms are interrelated. In addition to the transcriptome level, the influence of epigenetic regulation on sex determination and differentiation is also involved in sex determination in birds. The current precise gene editing techniques can provide a useful tool to better understand the sex related mechanisms of chickens in the future

Key words: Chicken, Female heterogametic system, Sex determination mechanism.

---

(1) Contribution No. 2646 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Physiology Division, COA-LRI, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(3) Technical Service Division, COA-LRI, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(4) Corresponding author, E-mail: hykuo@tlri.gov.tw.