

红耳龟性别分化相关基因的筛选与分析

刘芳, 马晓慧, 孙伟, 钱国英, 葛楚天

Screen and analysis of genes related to sexual differentiation in the red-eared slider turtle, *Trachemys scripta*

LIU Fang, MA Xiaohui, SUN Wei, QIAN Guoying, GE Chutian

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12024/jsou.20201103216>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

卵胎生许氏平Sox9基因的克隆、启动子分析、表达及其细胞定位研究

Cloning, promoter analysis, expression and cell localization of Sox9 gene in an ovoviparous teleost, black rockfish *Sebastes schlegeli*

上海海洋大学学报. 2020, 35(5): 671 <https://doi.org/10.16535/j.cnki.dlhyxb.2019-277>

暗纹东方sox9基因的克隆和组织表达分析

Molecular cloning and tissue expression analysis of sox9 gene in Takifugu obscurus

上海海洋大学学报. 2019, 28(6): 835 <https://doi.org/10.12024/jsou.20181202462>

雌雄罗非鱼对持续性高温的响应机制

Response mechanism of male and female Nile tilapia to persistent high temperature

上海海洋大学学报. 2021, 30(3): 426 <https://doi.org/10.12024/jsou.20200503050>

somatostatin1基因突变斑马鱼仔鱼转录组分析

Transcriptome sequencing analysis of somatostatin 1 gene mutation in zebrafish larvae

上海海洋大学学报. 2021, 30(5): 777 <https://doi.org/10.12024/jsou.20200403009>

三角帆蚌中WNT4基因克隆及表达分析

Cloning and expression analysis of WNT4 gene in the *Hyriopsis cumingii*

上海海洋大学学报. 2020, 29(6): 801 <https://doi.org/10.12024/jsou.20191202894>

文章编号: 1674-5566(2022)01-0039-13

DOI:10.12024/jsou.20201103216

红耳龟性别分化相关基因的筛选与分析

刘芳^{1,2}, 马晓慧^{1,2}, 孙伟¹, 钱国英^{1,2}, 葛楚天^{1,2}

(1. 浙江万里学院 生物与环境学院, 浙江 宁波 315100; 2. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306)

摘要: 温度依赖型性别决定 (temperature-dependent sex determination, TSD) 是一种奇特的表型可塑性现象, 但其背后的分子机制尚不清楚。红耳龟 (*Trachemys scripta*) 是一种典型 TSD 动物, 个体性别完全由胚胎发育时所处的环境温度决定。为提供更多能够解释 TSD 机制的基础数据, 选取红耳龟第 16 期产雄温度 (male-producing temperature, MPT) 和产雌温度 (female-producing temperature, FPT) 性腺, 采用 IlluminaHiSeq 2500 高通量平台进行转录组测序, 筛选出雌雄差异表达基因 474 个, 其中, MPT 高表达基因 283 个, FPT 高表达基因 191 个。通过与 NR、Swiss-Prot、GO、COG、KOG、KEGG 数据库进行比对, 获得 60 个 GO 功能注释分类和 139 条 KEGG 代谢通路。根据差异表达基因的功能注释分析发现: 参与红耳龟性别决定和分化的候选基因, 包括 *Dmrt1*、*Sox9*、*Foxl2* 等高度保守的性别分化基因, *Cyp11b1*、*Hsd11b2* 等类固醇激素代谢相关基因, 以及 *Hspb6*、*Dnaja4*、*Serpinh1* 等热敏性蛋白编码基因。最后, 通过荧光定量 PCR 和免疫荧光染色对部分候选基因进行表达验证, 与转录组结果相一致。该研究挖掘了一些新的温度响应因子和激素代谢相关因子, 为破译红耳龟 TSD 分子机制提供了基础。

关键词: 红耳龟; 转录组; 温度依赖型性别决定 (TSD); 性腺分化

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

脊椎动物的性别决定主要分为基因型性别决定 (genetic sex determination, GSD) 和环境依赖型性别决定 (environmental sex determination, ESD)^[1], 其中, 温度依赖型性别决定 (temperature sex determination, TSD) 属于 ESD 中最典型的一种模式。TSD 动物的性别不由遗传因素决定, 而是取决于特定胚胎时期——温度敏感期 (temperature sensitive period, TSP) 的环境温度, 该时期性腺对热信号敏感并具有性别双向分化的潜能^[2-3]。红耳龟 (*Trachemys scripta*) 被视为 TSD 研究的一种理想的动物模型, 26 °C 产雄温度 (male producing temperature, MPT) 下产出 100% 的雄性后代, 32 °C 产雌温度 (female producing temperature, FPT) 下产出 100% 的雌性后代^[4]。与哺乳动物^[5-6] 和鸡^[7] 等 GSD 研究相比, 目前 TSD 研究较为落后, 主要局限在组织学观察、性

别分化相关基因的两性差异表达等关联性分析, 尚未涉及功能鉴定和机制研究。20 世纪 90 年代开始, 学者们通过 PCR 和原位杂交等技术对 TSD 动物相关基因进行了克隆和表达分析, 锚定了一些潜在的性别发育基因, 如 *Wtl*^[8-9]、*Sfl*^[10-11]、*Dax1*^[12-13]、*Sox9*^[12,14-15]、*Dmrt1*^[12,16-17]、*Cyp19a1*^[18-19] 等。参与红耳龟性别分化的雄性关联基因有 *Sox9*^[14-15]、*Dmrt1*^[16-17]、*Mis/Amh*^[18] 等, 雌性分化关联基因有 *Cyp19a1*^[19-20]、*Rspo1*^[21]、*Foxl2*^[18] 等。这些基因是 GSD 动物性别分化的关键保守基因, 提示 TSD 和 GSD 机制很可能共享一套性别分化的下游信号通路。而关于环境温度如何转换成生物信号调控性别决定基因表达 (温度感受机制) 的研究非常少, 导致 TSD 机制长期未得到破解。采用基因组、转录组学等技术, 筛选一些能直接感受温度的温度敏感因子并进行

收稿日期: 2020-11-12 修回日期: 2021-05-17

基金项目: 国家重点研发计划子课题 (2018YFD0900203); 国家自然科学基金 (31922084, 31872960); 浙江省杰出青年科学基金 (LR19C190001); 宁波市公益类科技项目 (2019C10018)

作者简介: 刘芳 (1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向为龟性别决定机制。E-mail: 249298696@qq.com

通信作者: 葛楚天, E-mail: cge@zhu.edu.cn

功能鉴定将是推进 TSD 研究的一项重要举措。

目前, TSD 分子机制已有几种假说。首先, 类固醇激素被认为在 TSD 非哺乳脊椎动物的性别分化中发挥关键作用^[22]。糖皮质激素已被证明在包括爬行动物的多种脊椎动物中可诱导性逆转^[23-24], 而固醇类激素合成如何由温度来调节, 仍不清楚。其次, 表观遗传修饰能将环境因素和基因表达联系起来, 也已被证明参与性别发育过程, 如 *Kdm6B*^[25-26]。此外, 其他与温度应激相关的因素, 如热休克蛋白 HSPs (heat shock proteins, HSPs) 和冷诱导 RNA 结合蛋白 (cold inducible RNA binding proteins, CIRBPs) 也被视为在 TSD 中发挥作用^[19,27]。最近, CASTELLI 等^[28]还提出了关于环境信号与性别决定通路内在联系机制的模型, 指出 ESD 物种中细胞通过高度保守的氧化还原态钙 (CaRe)——主要由 Ca^{2+} 和活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 刺激后激活并感知环境信号, 转导相应信号通路, 或影响表观遗传过程来使性别有关基因差异表达。RADHAKRISHNAN 等^[29]为检测 TSD 和 GSD 物种在转录水平机制和作用环路是否一致, 比较分析了 TSP 前和 TSP 阶段的锦龟 (*Chrysemy spicta*) 性腺以及同时期的角鳖 (*Apalone spinifera*) 性腺转录组数据, 发现 TSD 物种对温度更为敏感。此外, *Cirbp* 基因在两个物种较高温度下上调, 表明热信号能转为生物信号来调控性别发育基因表达, 期间可能由“信号和激素通路”“RNA 绑定”“热休克通路”“Jak-Stat 信号通路”“Nf- κ B 信号通路”“Wnt 信号通路”等不同调控途径实现。但这仅是推测, 如何将温度和性别决定基因耦联起来有待进一步研究。

本研究选取第 16 期 (性别决定关键时期) 红耳龟 MPT 和 FPT 胚胎性腺组织, 制备测序文库, 比较分析性腺转录本, 筛选差异表达基因, 对温度敏感因子和类固醇激素通路着重展开讨论, 为研究红耳龟 TSD 的分子调控机制提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 红耳龟受精卵孵化与采集

本实验所用红耳龟卵购自湖南汉寿, 均采集于产卵后 12 h 内。设置温度 26 °C (MPT) 和 32 °C (FPT) 于恒温恒湿孵化箱进行孵化, 湿度保持在 75% ~ 85%。丢弃未受精的龟卵, 待发育到 15

期 (性腺开始分化) 时, 参考红耳龟发育图谱^[30], 收集 16 期 (性腺初形成)、23 和 25 期 (性别决定后) 的两性性腺, 一部分置于 Trizol 试剂 (Invitrogen, 美国) 以提取 RNA, 另一部分于 4% 多聚甲醛 (上海, 国药集团) 中固定 24 h, 乙醇梯度脱水后, 于 70% 乙醇 4 °C 长期保存, 以切片备用。

1.2 RNA 提取、测序文库构建及测序

分别采集 F16 和 M16 性腺, 每 20 对为 1 个混样, 各设 3 个生物学重复。根据 Trizol 试剂盒法 (Invitrogen, 美国), 用 Recombinant DNase I (TaKaRa, 日本) 除去基因组, 检测 RNA 完整程度, 采用微量核酸测定仪 (Nannodrop) 测定总 RNA 浓度、纯度, 根据 Fermentas 反转录试剂盒 (K1622, Thermo Scientific, 美国) 法实现文库构建。根据 Qubit2.0、Agilent 2100 和 Q-PCR 法确保文库浓度、质量后, 送至 IlluminaHiSeq 2500 平台上机测序 (委托北京百迈客完成)。

1.3 测序数据质量分析

所得的原始数据 (Raw Reads) 过滤后得到高质量的测序数据 (Clean Data)。计算 Q10、Q20、Q30、Q40、GC 含量和重复序列水平, 经 Trinity 进行序列拼接、过滤和组装获得高质量的 Unigene。

1.4 基因表达水平检测与差异表达筛选

根据 RSEM 估计基因定量表达水平, 结合 FPKM (Fragment Per Kilo Bases per Million reads) 值来呈现 Unigene 的表达量, 参照 Benjamini-Hochberg 法, 经显著性 P 域值校正, 以最终的 P —FDR (False Discovery Rate) 为标准。筛选出 $FDR \leq 0.01$ 且差异倍数 FC (Fold Change) ≥ 2 为显著性差异表达基因。

1.5 差异表达基因 GO 注释和 KEGG 代谢途径分析

使用 KOBAS 2.0 得到 Unigene 在 KEGG 中的注释结果, 运用 WEGO 和 KEGG 进行功能统计和代谢通路分类, 分析差异基因的富集情况, 挖掘更多性别相关且具有性别二态性表达的基因。

1.6 实时荧光定量 PCR 分析

将合成的 16 期两性性腺 cDNA 模板, 使用 SYBR[®] Premix (TaKaRa) 选择 10 个基因进行 qRT-PCR 扩增, 配置 12.5 L 反应液体体系如下: 6.25 μ L SYBR[®] Green I, 上下游引物各 0.5 μ L, cDNA 模板 1 μ L, 灭菌蒸馏水 4.25 μ L。Primer

5.0设计引物,以 *Gapdh* 作为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算分析转录过程的表达情况,所用引物见表 1。

表 1 所有引物序列
Tab. 1 Primers sequences

引物名称 Primer name	引物方向 Direction of primers	引物序列 Primer sequences
<i>Dmrt1</i>	F	ACTACCCTCCTGCCTCCTACCT
	R	CTCCTTTGGTGCTTTCATTGCT
<i>Amh</i>	F	CGGCTACTCCTCCCACACG
	R	CCTGGCTGGAGTATTTGACGG
<i>Kdm6B</i>	F	ACGTGAAATCCATTGTGCCCAT
	R	AGGCGATCTTCTCCCGAAC
<i>Hspb6</i>	F	CCCTTTGGGACAGCAGAATT
	R	CCAGCAGGTGAGTGGAGTTTAT
<i>Gata4</i>	F	TACCGTGACTTCCGCAACAA
	R	GCAGGGACAGGACCTCTTTATT
<i>Cyp11b1</i>	F	GGGTCTGTCTCGGTAGCACA
	R	CCGTCTTCGGGTTCATCCT
<i>Hsd17b1</i>	F	CTCTTTCACCAACCAGTTCCTC
	R	AGCACCACGGTCTTCTCCAT
<i>Hsd11b2</i>	F	GTGCTTGAGGCCGTTCCTGT
	R	AAAGTGAGCGTGATCCTACCC
<i>Dnaja4</i>	F	ATGGTGAAGGAGACGGGATACTACG
	R	CAGGTCCAATCTGCTGAACAA
<i>Serpinh11</i>	F	AGCTGAGCGATAAGGCAACC
	R	CCACAGGAGACACGAGGATG
<i>Gapdh</i>	F	GGCTTCCGTGTTCCAACCTC
	R	GACAACCTGGTCTCCTCCGTGATC

注:F为正向引物(Forward primer);R为反向引物(Reverse primer)。
Notes:F is Forward primer; R is Reverse primer.

1.7 苏木素-伊红染色和免疫荧光染色

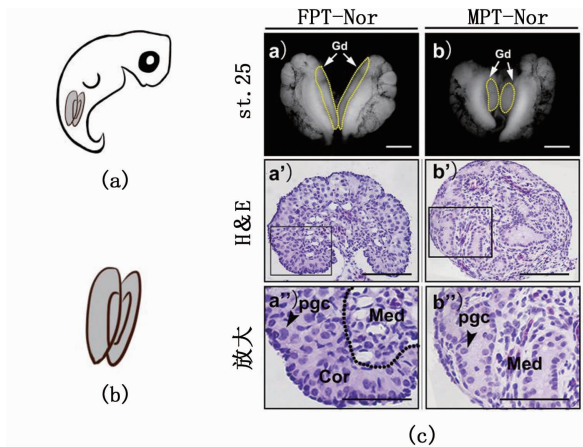
将 70% 乙醇中保存的 23、25 期两性性腺,经乙醇梯度脱水、二甲苯透明、浸蜡后,进行石蜡包埋,Leica 石蜡切片机(RM2235)制片,厚度为 6~8 μm 。成片通过脱蜡、乙醇梯度复水后,抗原修复液 95 $^{\circ}\text{C}$ 处理 20~30 min,室温备用。(1)苏木素-伊红染色:苏木素核染、分化、伊红染色、脱水、中性树脂封片、晾干,正置显微镜(Nikon)下观察拍照;(2)免疫荧光染色:封闭液室温孵育 1 h,吸去液体,分别孵育兔抗 SOX9(1:500, Millipore, USA)、兔抗 AMH(1:200, 华安生物)、羊抗 FOXL2(1:200, 华安生物)和鼠抗 CTNNB1(1:500, Sigma, USA),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。用磷酸盐 Triton X-100 缓冲液(PBST)清洗 15 min,重复 3 次。在室温避光环境下,滴加羊抗兔 IgG-488(1:500, Invitrogen)、驴抗羊 IgG-488(1:500, 联科生物)、

羊抗鼠 IgG-594(1:500, Invitrogen)和 DAPI(1:50, Sigma)稀释液,孵育 2 h,用 PBST 和洗脱液清洗 15 min,重复 3 次。采用抗荧光淬灭剂封片,于共聚焦荧光显微镜(Nikon, A1 Plus)下观察拍照。

2 结果

2.1 红耳龟胚胎性腺采集及形态学观察

16 期红耳龟胚胎示意图 1a 和 1b 可见,中肾复合物在靠近尾部位置。体视显微镜下观察到,25 期 FPT 性腺发育呈扁平、细长状(图 1c-a),MPT 性腺则相对短粗(图 1c-b),经苏木素-伊红染色后,结果显示:相比 25 期 FPT 性腺高度发育的皮质区,MPT 性腺退化为单细胞层;MPT 性腺髓质区中,原始性索上分布着许多生殖细胞,FPT 性腺的髓质区已完全退化(图 1c-a',1c-b')。



Gd. 性腺, 标尺. 1mm; pgc. 原始生殖细胞; Cor. 皮质区; Med. 髓质区, 标尺. 50 μm 。

Gd. gonad, Scale bar. 1 mm; pgc. primordial germ cell; Cor. cortical area; Med. medulla area, Scale bar. 50 μm .

图1 红耳龟胚胎性腺取样示意及组织形态学观察

Fig. 1 Gonad sampling scheme and histological observation of *T. scripta* gonads

表2 红耳龟胚胎性腺转录组组装结果

Tab. 2 Transcriptome assembly of *T. scripta* embryonic gonads

长度范围 Length range/bp	转录本 Transcripts		单基因簇 Unigenes	
	数量 Number/条	百分比 Percentage/%	数量 Number/条	百分比 Percentage/%
300 ~ 500	56 624	32.10	45 215	48.13
500 ~ 1 000	42 957	24.35	25 684	27.34
1 000 ~ 2 000	32 496	18.42	11 523	12.27
> 2 000	44 317	25.12	11 520	12.26
总数 Total	176 394		93 942	
总长度 Total length/bp	263 895 622		93 081 951	
N50 长度 N50 length/bp	2 724		1 695	
平均长度 Average length/bp	1 496.06		990.84	

表3 差异表达的编码转录本注释概述

Tab. 3 Overview of differentially expressed coding transcripts annotation

注释数据库 Database-annotated	COG 注释 GO-annotation	GO 注释 GO-annotation	KEGG 注释 KEGG-annotation	KOG 注释 KOG-annotation	Pfam 注释 Pfam-annotation	Swiss-Prot 注释 Swiss-Prot-annotation	Nr 注释 Nr-annotation	所有注释 All-annotation
DEG 注释数目 DEG number/条	109	157	243	235	324	266	360	360
DEG 百分比 DEG percentage/%	23.00	33.12	51.27	49.58	68.35	56.12	75.95	75.95

KEGG 注释结果显示, 474 个显著性差异基因被映射到 139 条代谢通路, 显著性富集最可靠的前 20 条通路[即 $\log_{10}(Q\text{-value})$ 越大, 可靠性越高]中, 排前三的有“补体和凝血级联”(21 个 DEG)、“类固醇激素代谢合成通路”(7 个 DEG)、“组氨酸代谢”(5 个 DEG), 见图 3a。同样, 在一

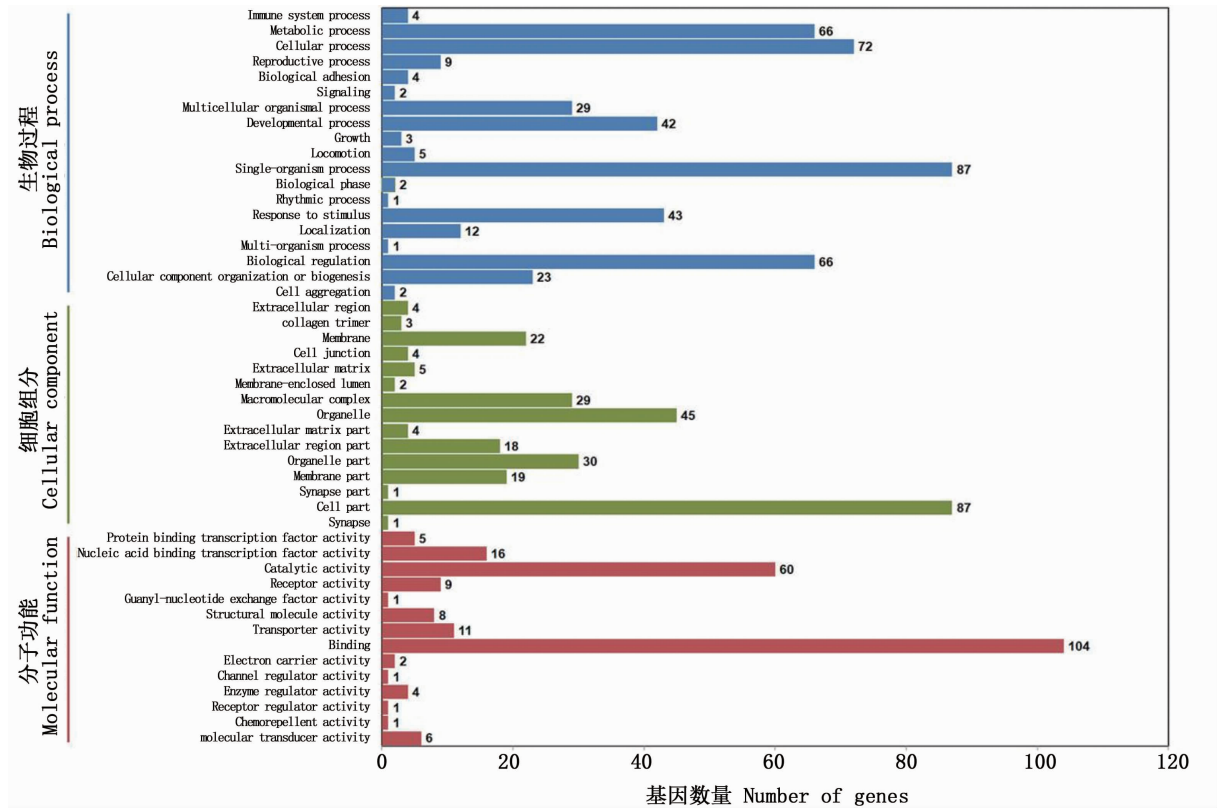
2.2 转录组测序和序列组装

测序所得的性腺转录本样品 Clean Data 均达到 2.38 Gb, Q30 碱基百分比均大于 89.54%, GC 含量在 50.32% ~ 52.32%。经组装共得 176 394 条转录本和 93 942 条 Unigene, Transcript、Unigene 的 N50 与平均长度分别为 2 724 bp、1 695 bp 和 1 496.06 bp、990.84 bp, 见表 2。

2.3 雌雄差异基因的功能注释

经 COG、GO、KEGG、KOG、Pfam 及 Swiss-Prot 数据库注释, 共获得 75.95% (474 个中的 360 个) DEG, 其中, NR 数据库中注释到的基因数最多, 360 (75.95%) 个, 具体 DEG 注释统计信息见表 3。GO 注释分为 3 个大类别, 257 个 DEG 被注释到 60 个 GO term 上, 注释数量最多三大子类别有: 生物学过程中的细胞过程, 87 个; 细胞组成中的细胞部分, 87 个; 分子功能中的结合, 104 个, 见图 2。

级分类的“环境信息处理”中, 筛选到 6 条涉及性别分化的途径: “PI3K-Akt 信号通路”、“TGF- β 信号通路”、“cAMP 信号通路”、“雌激素信号通路”、“Wnt 信号通路”、“炎症介质对 TRP 通道的调节”(图 3b)。经统计, 共有 243 个 DEG 涉及这前 20 条显著富集的 KEGG 通路中。



GO 三大类别下的子分支,分为生物过程(蓝色柱)、细胞组分(绿色柱)和分子功能(红色柱)。

A sub-branch of the three GO categories, divided into biological processes (blue bar), cellular components (green bar), and molecular functions (red bar).

图 2 差异表达基因 GO 功能注释统计

Fig. 2 Statistics of GO function annotation of differentially expressed genes

2.4 雌雄差异表达基因的筛选

所得测序结果,按 $FDR \leq 0.01$ 且差异倍数 $FC(\text{Fold Change}) \geq 2$ 和聚类分析筛选差异表达基因,共获 474 个性别偏向表达基因,相对于 FPT 性腺 DEGs,上调表达基因 283 个,下调表达基因 191 个(图 4a)。火山图展示了差异基因的表达情况,基因聚类分析呈现了基因整体的表达模式(图 4)。

为挖掘一些在 TSD 中起重要作用的基因,通过红耳龟早期性腺转录本,结合 GO 注释和 KEGG 代谢通路,筛选获得了参与性别决定、性腺发育和分化、信号转导等相关靶基因。转录组数

据显示,以 FPT 性腺为对照组,红耳龟 *Dmrt1*、*Amh*、*Sfl*、*Gata4* 基因在 MPT 性腺中显著上调。其中,*Kdm6B*、*Dmrt1* 和 *Amh* 的表达量分别约为 FPT 性腺中的 134 倍、16 倍和 30 倍。*Dmrt1* 参与雄性性别决定(GO:0030238)和支持细胞分化(GO:0060008)。*Amh* 的 KEGG 编码通路为 K04665,调控缪勒氏管的形成,指导雄性性别决定和性腺分化。*Sox9* 是脊椎动物雄性决定和睾丸分化的一种重要转录因子,该基因在 MPT 和 FPT 性腺中均高表达,推测其参与红耳龟早期性腺发育过程。

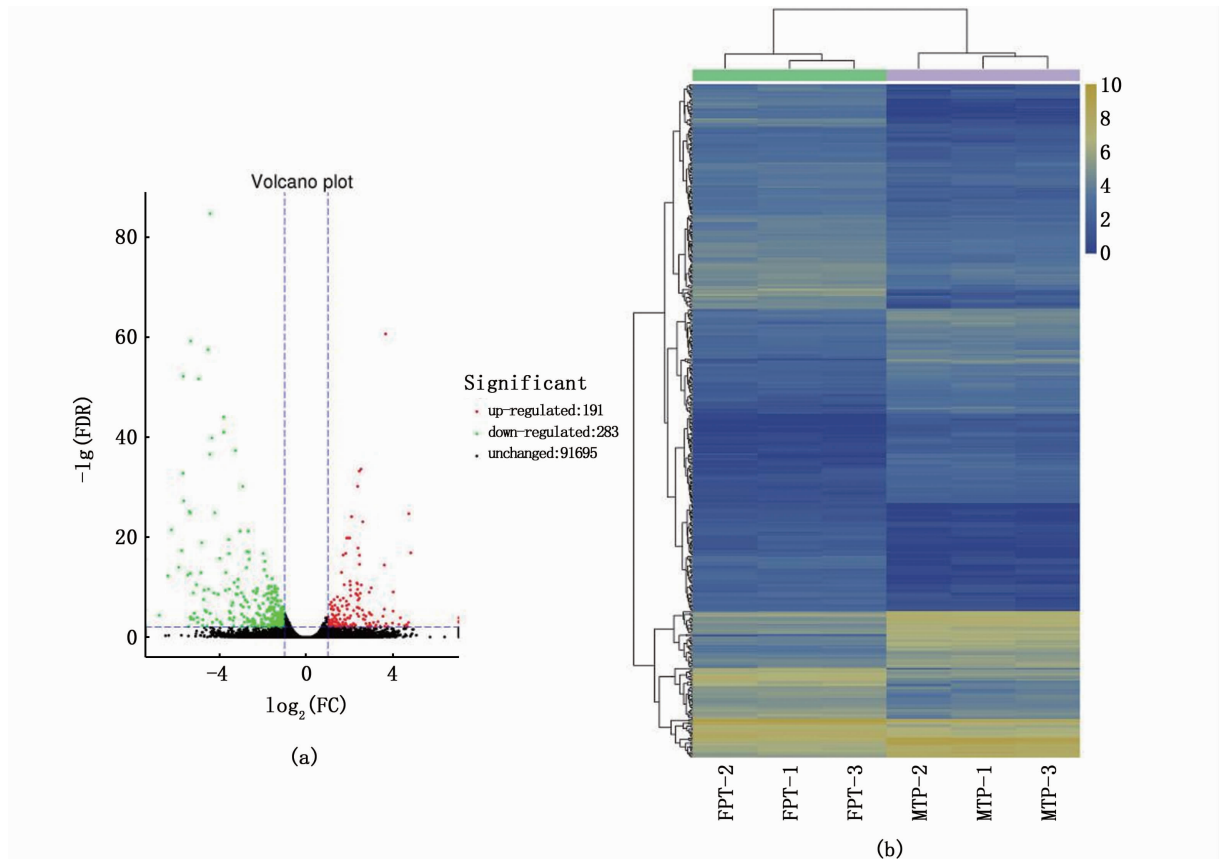


(a) X、Y 轴分别代表 KEGG 富集因子、KEGG 途径中差异表达的编码转录本的富集可靠性；(b) X、Y 轴分别为所注释对应通路的基因个数及其占有所有注释基因数的比率和代谢通路名称。

(a) X axis and Y axis respectively represent KEGG enrichment factors and the enrichment reliability of coding transcripts differentially expressed in the KEGG pathway; (b) X and Y axis are the number of genes in the corresponding pathway annotated and their ratio to all annotated genes and the name of metabolic pathway, respectively.

图3 差异表达基因 KEGG 通路分类

Fig. 3 Annotation classification of differentially expressed genes KEGG pathway



(a) 红色、绿色分别代表上、下调基因,黑色代表无显著性差异表达基因; (b) 蓝色为弱表达基因,黄色为高表达基因。
 (a) Red and green represent up-regulated and down-regulated genes, respectively, while black represent genes with no significant differential expression. (b) Blue is weakly expressed gene and yellow is highly expressed gene.

图 4 性腺差异表达基因火山图及聚类热图

Fig. 4 Volcano plot and heatmap of differentially expressed genes in turtle gonads

KEEG 富集散点图显示,类固醇激素代谢合成通路中有 7 个显著性差异表达的基因, *cytochrome P450 2C5-like*、*Akr1d1* 在 FPT 性腺中高表达, *Cyp11a1*、*Cyp11b1*、*Hsd3b1*、*Hsd17b1*、*Hsd11b2* 在 MPT 性腺中高表达(图 5a)。*cytochrome P450 2C5-like* 编码细胞色素 P450 2C5 酶,能催化孕酮的 21-羟基化,从而形成脱氧皮质酮。*Cyp11a1* 基因编码胆固醇侧链裂解酶是一种线粒体酶,催化胆固醇为孕烯醇酮,启动类固醇激素合成的第一步,是合成途径的关键调控位点。*Hsd3b1* 编码一种双功能酶,将 3beta-羟基-delta5 甾体前体氧化和异构化为 3-oxo-delta4 甾体,这是甾体激素生物合成的必要步骤。*Hsd17b1* 编码 17Beta-羟基类固醇脱氢酶,催化雌激素活化的最后一步,利用 NADPH 将雌激素 E1 和 E2 以及 4-雄烯二酮等雄激素转化为睾酮。同时,qRT-

PCR 结果也显示, *Cyp11b1*、*Hsd17b1*、*Hsd11b2* 在 MPT 中高表达,与测序数据一致(图 5c)。以上结果强烈提示类固醇激素对红耳龟性腺分化起着重要的调控作用。

近年来,热休克蛋白(HSP)和瞬时受体电位(TRP)离子通道蛋白是 TSD 温度感受机制研究的关注热点。转录组数据检测到 6 个 TRP 家族的基因和 7 个 HSP 家族的基因,在 16 期 MPT 和 FPT 性腺转录水平上出现差异表达,显著性差异表达有 6 个(*Trpv6*、*Trpm2*、*Trpm4*、*Dnaja4*、*Hspb6* 和 *Serpinh1*),见表 4。TRP 家族的差异表达基因中,与温度感受有关的 *Trpv2*、*Trpv4* 和 *Trpm4* 温度激活范围分别为 > 52 °C、> 27 °C 和 15 ~ 35 °C。其中 *Trpv4* 和 *Trpm4* 通道的温度激活范围与红耳龟孵化温度(26 ~ 32 °C)相吻合,这提示 *Trpv4* 和 *Trpm4* 很可能介导红耳龟 TSD 的温度感受过程。

表 4 红耳龟雌雄性腺差异表达的部分基因

Tab. 4 Several genes differentially expressed in male and female gonads of *T. scripta*

转录组 ID Transcript ID	基因名称 Gene name	FPT-Average FPKM	MPT-Average FPKM	log ₂ (FC)	Up/Down	KEGG orthology
c70762. graph_c0	<i>Dmrt1</i>	0.230 141 780	3.817 135 200	3.869 740 507	Up	-
c104965. graph_c1	<i>Sox9</i>	13.938 798 130	14.659 246 360	-0.076 548 353	Down	K18435
c100152. graph_c0	<i>Amh</i>	0.439 469 827	13.582 485 270	4.846 156 304	Up	K04665
c104286. graph_c0	<i>Sfl</i>	6.104 737 116	25.507 060 070	1.919 157 893	Up	K08560
c94829. graph_c1	<i>Gata4</i>	1.245 630 158	3.113 292 972	1.225 515 871	Up	K09183
c95115. graph_c1	<i>Kdm6B/JMJD3</i>	52.007 279 790	350.392 151 800	2.607 804 063	Up	K11448
c92281. graph_c0	<i>Cyp11a1</i>	9.402 121 259	55.308 850 960	2.390 665 074	Up	K04686
c102088. graph_c0	<i>Cyp11b1</i>	16.815 816 490	232.768 868 000	3.666 340 490	Up	K00497
c74992. graph_c0	<i>cytochrome P450 2C5-like</i>	2.004 081 887	0.197 880 322	-3.397 222 409	Down	K07413
c81378. graph_c0	<i>Akr1d1</i>	22.715 991 030	11.664 052 040	-1.102 855 072	Down	K00251
c105036. graph_c0	<i>Hsd3b1</i>	146.252 719 100	473.954 520 100	1.530 646 911	Up	-
c95265. graph_c0	<i>Hsd17b1</i>	14.394 534 280	32.502 253 080	1.029 476 239	Up	K00044
c96521. graph_c0	<i>Hsd11b2</i>	19.088 283 260	46.352 399 740	1.169 022 810	Up	K00071
c86084. graph_c0	<i>Dnaja4</i>	16.617 661 450	5.901 306 987	-1.613 824 011	Down	K09505
c80587. graph_c0	<i>Hspb6</i>	70.391 674 840	14.324 834 510	-2.451 642 994	Down	K09545
c104105. graph_c0	<i>Serpinh1</i>	135.341 907 800	37.815 903 230	-1.994 643 605	Down	K09501
c75803. graph_c0	<i>Trpv4</i>	0.720 088 050	0.887 864 059	0.169 901 039	Up	K04973
c85555. graph_c0	<i>Trpm4</i>	1.814 401 266	0.655 106 882	-1.564 257 643	Down	K04979

2.5 实时荧光定量 PCR 和免疫组化染色

为确定转录组测序结果的可靠性,选取 9 个基因进行 qPCR 验证,结果表明:在 16 期两性性腺中,所选基因的 mRNA 表达水平与转录组测序结果相一致,且 *Dmrt1*、*Amh*、*Kdm6B*、*Gata4*、*Cyp11b1*、*Hsd17b1*、*Hsd11b2* 在 MPT 性腺中的表达水平较高,而 *Hspb6*、*Dnaja4*、*Serpinh1* 在 FPT 性腺中表达较高(图 6)。同样,SOX9、AMH 和 FOXL2 蛋白的免疫荧光染色也表明:在 25 期 MPT 性腺中,SOX9 和 AMH 蛋白大量表达,分别定位在髓质区支持细胞的细胞核和细胞质中,FPT 性腺中则未检测到荧光信号(图 7a,7b)。相反,FOXL2 在 23 期 FPT 性腺中大量表达,分布于髓质区体细胞细胞核,MPT 性腺中未见表达,见图 7c。

3 讨论

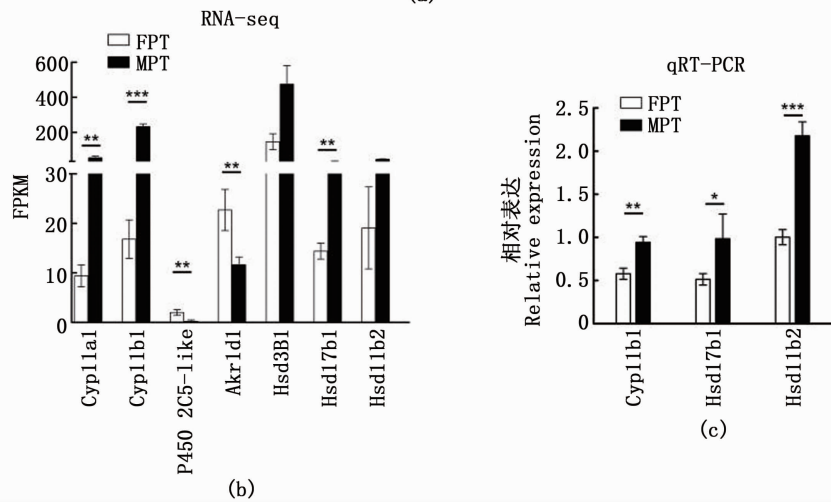
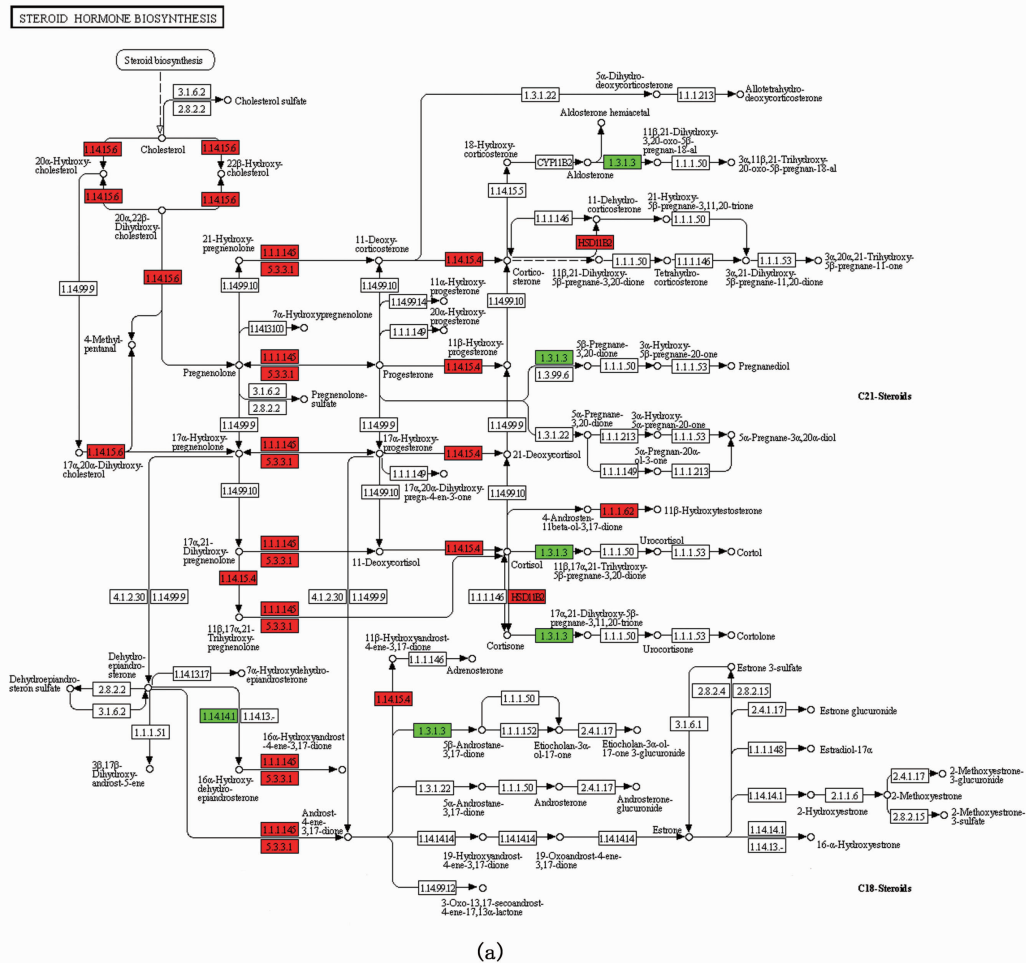
动物性别决定和分化长期以来都是生物学的研究热点。自 *Sry* 雄性性别决定基因^[31]被发现以来,GSD 动物中其他性别决定基因如 *Dmy*、*Dm-w*、*Dmrt1*、*Amhy*、*Gsdfy*、*Amhr2* 陆续被研究报道^[32-38],并获得许多阐述详尽的分子调控通路。在 TSD 动物中,GE 等在红耳龟上发现组蛋白去甲基化酶 *Kdm6B* 通过去除 *Dmrt1* 启动子区的 *H3K27me3* 标记,直接激活 *Dmrt1* 转录,从而启动雄性性腺分化^[39]。但 TSD 的机制研究仅仅局限

在某几个物种上,研究深度远落后于 GSD。本研究分析了红耳龟早期性腺转录组,筛选到 474 个性别相关 DEGs,除报道较多的 *Dmrt1*、*Amh*、*Sox9* 和 *Sfl*^[37-38,40-43] 外,通过 GO 和 KEGG 分析发现 *Cyp11a1*、*Cyp11b1*、*Akr1d1* 等在“类固醇激素代谢合成”性别分化相关的通路中显著富集(图 5a),以及 *Trpv4*、*Trpm4*、*Dnaja4*、*Hspb6*、*Serpinh1* 等在热信号传导中呈差异表达(表 4)。因此,TSD 机制很可能构成了一个极其复杂的网络,由多基因多途径共同调控性别决定和分化。本研究主要对类固醇激素代谢合成通路和温度敏感因子重点筛选分析。

类固醇激素代谢合成通路中,*Cyp11a1* 作为控制类固醇生物合成的第一步和限速步骤,经垂体激素的控制,通过 CAMP 信号通路在肾上腺皮质和性腺中表达^[44]。*Sfl* 与 *Cyp11a1* 的启动子结合,在类固醇基因的组织特异性和激素调控表达中起重要的作用^[45]。我们转录组数据显示 *Cyp11a1* 和 *Cyp11b1* 在 MPT 性腺中显著上调。MARTÍN 等认为 *Cyp11a1* 在胡子鲶 (*Clarias batrachus*) 发育成熟的睾丸中高表达,可能参与调节硬骨鱼性腺外或循环类固醇水平^[46]。*Cyp11b1* 是编码由睾酮产生 11 β -羟基睾酮的关键酶,博纳里牙汉鱼 (*Odontes thesbonariensis*) 中已证实 *Cyp11b1* 表达与睾丸的形态分化呈正相关^[47]。

由此可推出,这两个基因具有促进睾丸分化的重要作用。转录组数据中 *Akr1d1* 表达下调(即 FPT 高表达),而 CREWS 等认为红耳龟、鸟类中 *Akr1d1*

在 MPT 表达是另一个潜在的雄性化机制^[48],这与国外推测的研究结果相反。*cytochrome P450 2C5-like* 涉及含血清素的神经突触、炎症介质对 TRP



(a) 红色、绿色分别代表上、下调基因; (b) 和 (c) $n \geq 3$, 柱状图上方 “*” 代表差异显著 ($P < 0.05$)。

(a) Red and green represent up-regulated and down-regulated genes, respectively; (b) and (c) $n \geq 3$, “*” at the top of the bar chart represents significant difference ($P < 0.05$).

图 5 类固醇激素代谢合成通路中的差异表达基因及部分验证结果

Fig. 5 Differentially expressed genes and several validation results in steroid hormone synthesis pathway

通道的调节、类固醇类激素生物合成等过程,表明其参与着重要基础生命代谢合成过程。此外,转录组和 qPCR 虽检测到 *Hsd3b1*、*Hsb17b1*、*Hsd11b2* 的差异表达,但目前并没有这些基因参与性别调控过程的相关报道,有待进一步研究。

PIEAU^[49]于1999年已提出热敏感基因能直接或间接激活芳香化酶,作用于 GPCR 型受体后,由蛋白激酶 A 使 *Trpv4* 敏感;另一种则由热休克蛋白参与雌激素受体的结合或解离发挥作用^[50]。研究^[50]表明 TRP 通道响应温度刺激形成钙离子流,降钙素能作为温度调节器调节哺乳动物的血清钙激素。因此,它作为介质使温度诱导性腺中的钙离子流,本研究结果显示,与钙离子有关的热敏感基因 *Trpv4*、*Trpm4* 呈差异表达,其温度激活范围分别为 $>27\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $15\sim 35\text{ }^{\circ}\text{C}$,与红耳龟孵化温度($26\sim 32\text{ }^{\circ}\text{C}$)相吻合^[51-52],推测很可能通过温度激活下游靶基因参与调控决定性别和分化过程。本研究还发现热休克蛋白家族的 *Dnaj4*、*Hspb6*、*Serpinh1* 呈现差异表达。目前,大鳞大马哈鱼 *Oncorhynchus tshawytscha*、虹鳟 *Oncorhynchus mykiss* 等鱼类中 *HSP70* 和 *HSP90* 的表达会随着水温变化而改变^[53-54]。此外,*HSP70* 已被证实能与 *Sox9a*、*Gata4* 和 *Lhx6* 一起参与罗

非鱼的性腺发育过程,且 *HSP70* 在睾丸中呈高表达^[55]。同样,猜测 *Dnaj4*、*Hspb6*、*Serpinh1* 很可能在红耳龟性别分化过程中也起到高温候选传感器的作用。综上,TRP 蛋白编码基因和 HSP 热休克蛋白基因很可能响应温度通过钙调素或其他某种未知方式,直接调控下游靶基因或激素来影响性腺性别分化过程。

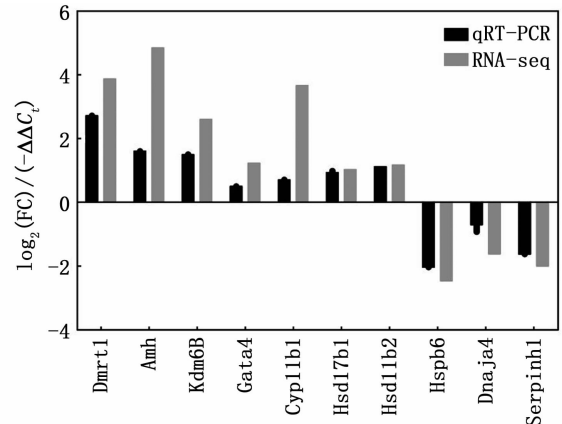
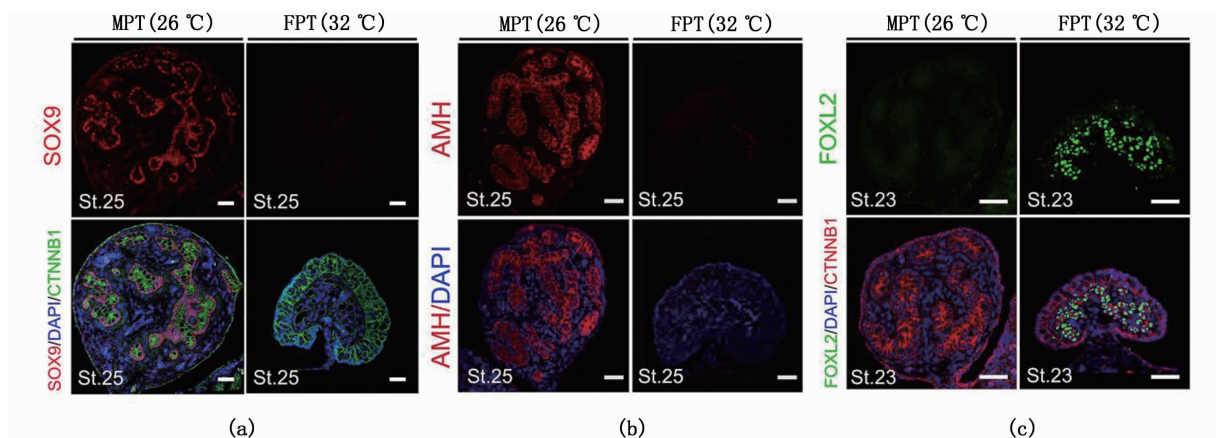


图6 部分差异表达基因的 qRT-PCR 与转录组的比较分析

Fig. 6 Comparative analysis of several selected differentially expressed genes by qRT-PCR and transcriptome



标尺: $50\mu\text{m}$ 。
Scale bar: $50\mu\text{m}$ 。

图7 3个差异表达基因的免疫组化验证

Fig. 7 Immunohistochemical verification of three differentially expressed genes

激素、热敏性基因与性别相关基因的网络尤为复杂,候选基因能否在性别分化过程中起到关键作用,还有待进一步证实。通过此次研究,我们筛选获得了与红耳龟性别有关的候选基因,结合相关通路和研究报道,分析并预测了性别分化

的靶向基因,为进一步阐明红耳龟 TSD 机制提供基础数据。

4 总结

本研究对红耳龟 16 期两性性腺进行了转录

组测序,经 GO 注释和 KEGG 功能富集分析,发现雌雄差异表达转录本主要在“类固醇激素代谢合成通路”“PI3K-Akt 信号通路”“cAMP 信号通路”“TGF- β 信号通路”“Wnt 信号通路”“雌激素信号通路”“TRP 通道”等与性别分化相关的通路中显著富集。所筛基因可能是爬行动物 TSD 机制研究的重要目标基因,包括 *Dmrt1*、*Sox9*、*Foxl2* 等高度保守的性别分化基因,*Cyp11b1*、*Hsd11b2* 等类固醇激素代谢相关基因,以及 *Hspb6*、*Dnaja4*、*Serpinh1* 等热敏性蛋白编码基因,这为解析 TSD 分子机制提供了基础数据。

感谢实验室其他成员在红耳龟卵孵化和取样过程中的帮助。

参考文献:

- [1] VALENZUELA N, ADAMS D C, JANZEN F J. Pattern does not equal process: exactly when is sex environmentally determined? [J]. *The American Naturalist*, 2003, 161 (4): 676-683.
- [2] SHOEMAKER C M, QUEEN J, CREWS D. Response of candidate sex-determining genes to changes in temperature reveals their involvement in the molecular network underlying temperature-dependent sex determination [J]. *Molecular Endocrinology*, 2007, 21 (11): 2750-2763.
- [3] SHOEMAKER-DALY C M, JACKSON K, YATSU R, et al. Genetic network underlying temperature-dependent sex determination is endogenously regulated by temperature in isolated cultured *Trachemys scripta* gonads [J]. *Developmental Dynamics*, 2010, 239(4): 1061-1075.
- [4] MATSUMOTO Y, CREWS D. Molecular mechanisms of temperature-dependent sex determination in the context of ecological developmental biology[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2012, 354(1/2): 103-110.
- [5] LIU C F, LIU C, YAO H C. Building pathways for ovary organogenesis in the mouse embryo[J]. *Current Topics in Developmental Biology*, 2010, 90: 263-290.
- [6] MUNGER S C, NATARAJAN A, LOOGER L L, et al. Fine time course expression analysis identifies cascades of activation and repression and maps a putative regulator of mammalian sex determination[J]. *PLoS Genetics*, 2013, 9 (7): e1003630.
- [7] AYERS K L, DAVIDSON N M, DEMIYAH D, et al. RNA sequencing reveals sexually dimorphic gene expression before gonadal differentiation in chicken and allows comprehensive annotation of the W-chromosome [J]. *Genome Biology*, 2013, 14(3): R26.
- [8] 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* [J]. *Journal of Experimental Zoology*, 1998, 281(5): 417-427.
- [9] VALENZUELA N. Relic thermosensitive gene expression in a turtle with genotypic sex determination [J]. *Evolution*, 2007, 62(1): 234-240.
- [10] 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[J]. *Evolution & Development*, 2006, 8(5): 424-432.
- [11] RAMSEY M, SHOEMAKER C, CREWS D. Gonadal expression of *Sfl* and aromatase during sex determination in the red-eared slider turtle (*Trachemys scripta*), a reptile with temperature-dependent sex determination [J]. *Differentiation*, 2007, 75(10): 978-991.
- [12] MALDONADO L C T, PIEDRA A L, MENDOZA N M, et al. Expression profiles of *Dax1*, *Dmrt1*, and *Sox9* during temperature sex determination in gonads of the sea turtle *Lepidochelys olivacea* [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2002, 129(1): 20-26.
- [13] VALENZUELA N. Evolution of the gene network underlying gonadogenesis in turtles with temperature-dependent and genotypic sex determination[J]. *Integrative and Comparative Biology*, 2008, 48(4): 476-485.
- [14] BARSKE L A, CAPEL B. Estrogen represses *SOX9* during sex determination in the red-eared slider turtle *Trachemys scripta*[J]. *Developmental Biology*, 2010, 341(1): 305-314.
- [15] MATSUMOTO Y, YATSU R, TAYLOR C, et al. Changes in gonadal gene network by exogenous ligands in temperature-dependent sex determination [J]. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2013, 50(3): 389-400.
- [16] VALENZUELA N. Multivariate expression analysis of the gene network underlying sexual development in turtle embryos with temperature-dependent and genotypic sex determination [J]. *Sexual Development*, 2010, 4(1/2): 39-49.
- [17] KETTLEWELL J R, RAYMOND C S, ZARKOWER D. Temperature-dependent expression of turtle *Dmrt1* prior to sexual differentiation[J]. *Genesis*, 2000, 26(3): 174-178.
- [18] SHOEMAKER C M, CREWS D. Analyzing the coordinated gene network underlying temperature-dependent sex determination in reptiles [J]. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 2009, 20(3): 290-303.
- [19] MATSUMOTO Y, BUEMIO A, CHU R, et al. Epigenetic control of gonadal aromatase (*cyp19a1*) in temperature-dependent sex determination of red-eared slider turtles [J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e63599.
- [20] VALENZUELA N, SHIKANO T. Embryological ontogeny of *aromatase* gene expression in *Chrysemys picta* and *Apalone muticaturtles*: comparative patterns within and across temperature-dependent and genotypic sex-determining mechanisms[J]. *Development Genes and Evolution*, 2007, 217(1): 55-62.
- [21] SCHROEDER A L, METZGER K J, MILLER A, et al. A novel candidate gene for temperature-dependent sex determination in the common snapping turtle [J]. *Genetics*, 2016, 203(1): 557-571.
- [22] LANCE V A. Is regulation of aromatase expression in reptiles the key to understanding temperature-dependent sex

- determination? [J]. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 2009, 311A(5): 314-322.
- [23] NAKAMURA M. The mechanism of sex determination in vertebrates—are sex steroids the key-factor? [J]. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 2010, 313A(7): 381-398.
- [24] WARNER D A, RADDER R S, SHINE R. Corticosterone exposure during embryonic development affects offspring growth and sex ratios in opposing directions in two lizard species with environmental sex determination [J]. *Physiological and Biochemical Zoology*, 2009, 82(4): 363-371.
- [25] PIFERRER F. Epigenetics of sex determination and gonadogenesis [J]. *Developmental Dynamics*, 2013, 242(4): 360-370.
- [26] PARROTT B B, KOHNO S, CLOY-MCCOY J A, et al. Differential incubation temperatures result in dimorphic DNA methylation patterning of the *SOX9* and aromatase promoters in gonads of alligator (*Alligator mississippiensis*) embryos [J]. *Biology of Reproduction*, 2014, 90(1): 2.
- [27] NAVARRO-MARTIN L, VIÑAS J, RIBAS L, et al. DNA methylation of the gonadal aromatase (*cyp19a*) promoter is involved in temperature-dependent sex ratio shifts in the European sea bass [J]. *PLoS Genetics*, 2011, 7(12): e1002447.
- [28] CASTELLI M A, WHITELEY S L, GEORGES A, et al. Cellular calcium and redox regulation: the mediator of vertebrate environmental sex determination? [J]. *Biological Reviews*, 2020, 95(3): 680-695.
- [29] RADHAKRISHNAN S, LITERMAN R, NEUWALD J, et al. Transcriptomic responses to environmental temperature by turtles with temperature-dependent and genotypic sex determination assessed by RNAseq inform the genetic architecture of embryonic gonadal development [J]. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0172044.
- [30] GREENBAUM E. A standardized series of embryonic stages for the emydid turtle *Trachemys scripta* [J]. *Canadian Journal of Zoology*, 2002, 80(8): 1350-1370.
- [31] KOOPMAN P, GUBBAY J, VIVIAN N, et al. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry [J]. *Nature*, 1991, 351(6322): 117-121.
- [32] MATSUDA M, NAGAHAMA Y, SHINOMIYA A, et al. *DMY* is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medakafish [J]. *Nature*, 2002, 417(6888): 559-563.
- [33] MYOSHO T, OTAKE H, MASUYAMA H, et al. Tracing the emergence of a novel sex-determining gene in medaka, *Oryzias luzonensis* [J]. *Genetics*, 2012, 191(1): 163-170.
- [34] YOSHIMOTO S, OKADA E, UMEMOTO H, et al. A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(7): 2469-2474.
- [35] SMITH C A, ROESZLER K N, OHNESORG T, et al. The avian Z-linked gene *Dmrt1* is required for male sex determination in the chicken [J]. *Nature*, 2009, 461(7261): 267-271.
- [36] CAPEL B. Vertebrate sex determination: evolutionary plasticity of a fundamental switch [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2017, 18(11): 675-689.
- [37] BISHOP C E, WHITWORTH D J, QIN Y J, et al. A transgenic insertion upstream of *Sox9* is associated with dominant XX sex reversal in the mouse [J]. *Nature Genetics*, 2000, 26(4): 490-494.
- [38] VALENZUELA N, NEUWALD J L, LITERMAN R. Transcriptional evolution underlying vertebrate sexual development [J]. *Developmental Dynamics*, 2013, 242(4): 307-319.
- [39] GE C T, YE J, WEBER C, et al. The histone demethylase KDM6B regulates temperature-dependent sex determination in a turtle species [J]. *Science*, 2018, 360(6389): 645-648.
- [40] EGGERS S, OHNESORG T, SINCLAIR A. Genetic regulation of mammalian gonad development [J]. *Nature Reviews Endocrinology*, 2014, 10(11): 673-683.
- [41] KUROKI S, MATOBA S, AKIYOSHI M, et al. Epigenetic regulation of mouse sex determination by the histone demethylase *Jmjd1a* [J]. *Science*, 2013, 341(6150): 1106-1109.
- [42] MORRISH B C, SINCLAIR A H. Vertebrate sex determination: many means to an end [J]. *Reproduction*, 2002, 124(4): 447-457.
- [43] KOHNO S, PARROTT BB, YATSU R, et al. Gonadal differentiation in reptiles exhibiting environmental sex determination [J]. *Sexual Development*, 2014, 8(5): 208-226.
- [44] TOIT R L D, STORBECK K H, CARTWRIGHT M, et al. Progestins used in endocrine therapy and the implications for the biosynthesis and metabolism of endogenous steroid hormones [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2017, 441: 31-45.
- [45] GUO I C, HU M C, CHUNG B C. Transcriptional regulation of *CYP11A1* [J]. *Journal of Biomedical Science*, 2003, 10(6): 593-598.
- [46] RAJAKUMAR A, SENTHILKUMARAN B. Expression analysis of *cyp11a1* during gonadal development, recrudescence and after hCG induction and sex steroid analog treatment in the catfish, *Clarias batrachus* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2014, 176: 42-47.
- [47] BLASCO M, FERNANDINO J I, GUILGUR L G, et al. Molecular characterization of *cyp11a1* and *cyp11b1* and their gene expression profile in pejerrey (*Odontes thesbonariensis*) during early gonadal development [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2010, 156(1): 110-118.
- [48] CZERWINSKI M, NATARAJAN A, BARSKE L, et al. A timecourse analysis of systemic and gonadal effects of temperature on sexual development of the red-eared slider turtle *Trachemys scripta elegans* [J]. *Developmental Biology*, 2016, 420(1): 166-177.
- [49] PIEAU C, DORIZZI M, RICHARD-MERCIER N. Temperature-dependent sex determination and gonadal differentiation in reptiles [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*,

- 1999, 55(6): 887-900.
- [50] DARBY W G, GRACE M S, BARATCHI S, et al. Modulation of TRPV4 by diverse mechanisms[J]. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2016, 78:217-228.
- [51] MARTÍNEZ-JUÁREZ A, LÓPEZ-LUNA M A, PORRAS-GÓMEZ T J, et al. Expression of the *Sox9*, *Foxl2*, *Vasa*, and *TRPV4* genes in the ovaries and testes of the Morelet's crocodile, *Crocodylus moreletii*[J]. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 2018, 330(3): 148-164.
- [52] MONTELL C. The TRP superfamily of cationchannels[J]. *Science's STKE*,2005(272): re3.
- [53] PALMISANO A N, WINTON J R, DICKHOFF W W. Tissue-specific induction of Hsp90 mRNA and plasma cortisol response in Chinook salmon following heat shock, seawater challenge, and handling challenge [J]. *Marine Biotechnology*, 2000, 2(4): 329-338.
- [54] NAKANO K, IWAMA G K. The 70-kDa heat shock protein response in two intertidal sculpins, *Oligocottus maculosus* and *O. snyderi*: relationship of hsp70 and thermal tolerance[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2002, 133(1): 79-94.
- [55] TAOW J, CHEN J L, TAND J, et al. Transcriptome display during tilapia sex determination and differentiation as revealed by RNA-Seqanalysis[J]. *BMC Genomics*, 2018, 19(1): 363.

Screen and analysis of genes related to sexual differentiation in the red-eared slider turtle, *Trachemys scripta*

LIU Fang^{1,2}, MA Xiaohui^{1,2}, SUN Wei¹, QIAN Guoying^{1,2}, GE Chutian^{1,2}

(1. College of Biological and Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, Zhejiang, China; 2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Temperature-dependent sex determination is a notable model of phenotypic plasticity; however, its underlying molecular mechanism remains unclear. As a typical TSD species, the red-eared slider turtle (*Trachemys scripta*) has its offspring gender completely determined by incubation temperature. In order to provide more basic data for illustrating the TSD mechanism, transcriptome sequencing was performed on *T. scripta* early embryonic gonads of stage 16 at different temperature (male-producing temperature (MPT) and female-producing temperature(FPT)) in this study. IlluminaHiseq 2500 high-throughput platform was used for transcriptome sequencing. A total of 474 differentially expressed genes were screened out, among which 283 genes showed MPT higher expression and 191 genes showed FPT higher expression. By comparing with NR, Swiss-Prot, GO, COG, KOG and KEGG databases, 60 GO functional annotation classifications and 139 KEGG metabolic pathways were obtained. According to functional annotation of differentially expressed genes, these candidates included: sex determination and differentiation related conserved genes, such as *Dmrt1*, *Sox9*, *Foxl2*, etc; steroid hormone metabolism related genes, such as *Cyp11b1*, *Hsd11b2*, etc; heat-sensitive protein coding genes, such as *Hspb6*, *Dnaja4*, *Serpinh1*, etc. Several selected candidates were verified by quantitative PCR and immunofluorescence. In conclusion, some new temperature sensitive and hormone metabolism related factors were found out from RNA-seq data of turtle embryonic gonads, providing basic support for illustration of the molecular mechanism of TSD.

Key words: *Trachemys scripta*; transcriptome; temperature-dependent sex determination (TSD); gonadal differentiation