

A kecskék szarvatlanságához kapcsolódó interszexualitás vizsgálata

¹Bordán Judit – ¹Kovács András – ^{2,3}Bodó Szilárd

¹Debreceni Egyetem Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar,
Állattudományi, Biotechnológiai és Természetvédelmi Intézet, Debrecen

²Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet, Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ, Gödöllő

³Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar,
Állattenyésztés-tudományi Intézet, Gödöllő
bordán@agr.unideb.hu

ÖSSZEFOGLALÁS

A fordított ivar minden emlős fajban előfordulhat, de csak a kecskénél kapcsolódik egy kívánatosnak tartott tulajdonsághoz, a szarvatlansághoz. A szarvatlanság terjedésével egy időben a kecskepopulációkban abnormális ivarárány eltolódást is megfigyeltek, amelyhez a fenotípusosan hím egyedek egy részének a sterilitása is kapcsolódott. Ezek a hímek 60, XX kariotípusúak. Kecskénél a PIS (Polled Intersex Syndrome) mutáció okozza a szarvatlanságot a heterozigóta és a homozigóta állapotokban. Ugyanez a mutáció növeli a hím irányú ivarátfordulást idéző elő, de csak a szarvatlanságra homozigóta XX egyedekben. A PIS mutáció gátolja a FOXL2 génexpresszióját, amely felelős a petefészkek sejtjeinek kialakulásáért és működéséért, valamint az általa kódolt fehérje egy másik, Sox9 elnevezésű gén működését gátolja. A Sox9 gén a here sejtjeinek fejlődését serkenti. Amikor a FOXL2 gén gátolt, a Sox9 átveszi a hatalmat, és a petefészkek sejtjeit heresejteké alakítja. Cikkünkben röviden bemutatjuk három, általunk talált interszex egyed küllemi és kromoszóma vizsgálatát.

Kulcsszavak: kecske, PIS mutáció, ivarátfordulás

SUMMARY

The sex reversal may occur in all mammalian species, but is connected to a favourable trait – the polledness – only in the goat. Later abnormal sex ratio was noticed in these goat populations, in which a part of the phenotypically male individuals was sterile. These males have two X chromosomes. In goats the PIS (Polled Intersex Syndrome) mutation is responsible for the absence of horns in homozygous and heterozygous individuals. This same mutation causes a female-to-male sex reversal, but only in the homozygous polled genetic female goats. The PIS mutation inhibits the expression of the FOXL2 gene which is responsible for ovary development, and a protein encoded by this gene inhibits the activity of the Sox9 gene. The Sox9 gene stimulates the development of the cells of the testis. When the FOXL2 gene is inhibited, the Sox9 gene is activated and transforms the ovary cells into testis cells. In our article we briefly introduce the morphological and chromosome investigations of three intersex individuals we found.

Keywords: goat, PIS mutation, sex reversal

BEVEZETÉS

Elsődleges ivardetermináció az emlősökben

Az elsődleges ivardetermináció az ivarmirigyek meghatározását jelenti. Emlősökben az elsődleges ivar meghatározás szigorúan kromoszomális, és nem befolyásolják környezeti hatások. Emlősökben, az Y-kromoszóma jelenléte határozza meg az ivart. Normális esetben a nőstényektől származó sejtek két X-kromoszómát, míg a hímeiktől származók egy X- és egy Y-kromoszómát tartalmaznak. Minden egyes egyednek minden szomatikus sejtjében kell, hogy legyen legalább egy X-kromoszóma.

Alkalmanként szülehetnek egyedek ivari kromoszóma aneuploidióval, amelynek következtében megváltozik az adott fajra jellemző kromoszómaszám. Ezt a jelenséget általában valamilyen abnormális sejtosztódás okozza. Ennek a genetikai rendellenességnek a leggyakoribb oka egy extra vagy egy hiányzó kromoszóma. Az egyedek ivarát minden esetben az Y-kromoszóma jelenléte vagy hiánya határozza meg. Így tehát az XXY és az XYY kariotípusú élőlények hímivarúak, az XXX kariotípusúak pedig nőstények lesznek (Griffiths et al., 2000; Weaver et al., 2006).

Azok az egyedek viszont, amelyeknek csak egyetlen X-kromoszómájuk van, és nincs második X- vagy Y-kromoszómájuk (azaz XO), nőivarúvá fejlődnek és van petefészük, habár ezek fejletlenek és a tüszők sem érnek meg (Gilbert, 2000; Hake és O'Connor, 2008).

Már sok méhlepényes emlős Y-kromoszómáján sikerült azonosítani az SRY gént, amely a TDF (testis determining factor – here-meghatározó faktor) transzkripciós faktort kódolja. Azonban a madarak (Aves) és a kloákás emlősök (Monotremata) esetében nem sikerült felfedezni ezt a gént (Shetty et al., 1999; Waters et al., 2005).

Az SRY gént (Sex-determining Region of the Y chromosome) Andrew Sinclair és munkatársai fedezték fel 1990-ben (Sinclair et al., 1990). Az SRY gén az a kapcsoló, amely az emlősöknél meghatározza az embrió ivarát. A működő SRY gén jelenlétében az embrió differenciálatlan ivarmirigyei hereszövevé fejlődnek, a herékben tesztoszteron és antimüller hormon (AMH) szekretálódik, és ezáltal az embrió hímivarúvá fejlődik. Az SRY gén hiányában az ivarmirigyekből petefészkek alakul ki; így tesztoszteron és AMH nem szekretálódik, aminek következtében nőivarú lesz az utód.

Másodlagos ivardetermináció

Az elsődleges ivardetermináció a petefészek, illetve a here ivarmirigyekből történő kialakulását foglalja magába. Ez azonban nem elegendő a teljes ivari fenotípus kialakításához. A hím és női fenotípus kialakulása a másodlagos ivardetermináció során történik, válaszul a here illetve a petefészek által szekretált hormonokra (Gilbert, 2000).

Az ivarmirigyek hiányában női fenotípus alakul ki. Jost (1953) nyúlmagzatok ivarszerveit távolította el, mielőtt még azok differenciálódtak volna. Ennek eredményeként az összes magzatnak női fenotípusa lett, tekintet nélkül arra, hogy azelőtt XX vagy XY genotípusúak voltak. Mindegyiknek volt méhe, petefészke, de egyiküknek sem volt hím nemi szerve.

Emlősökben a kromoszómális ivar a megtermékenyülés pillanatában eldől, normális körülmények között a megtermékenyült petesejt vagy XX vagy XY ivari kromoszómákat tartalmaz, és osztódásakor is ugyanilyen kromoszómakészletet visz át az utódsejtekbe.

A kecskék kromoszómái

A fajra jellemző kromoszómaszám $2n=60$, melyeknek mindegyike akrocentrikus (a centroméra a kromoszóma végéhez közel található), kivéve az Y-kromoszómát, amelyik metacentrikus (a centroméra közepén van) esetleg szubmetacentrikus és egyben a legkisebb kromoszóma (Basrur és Stoltz, 1967; Makino, 1967). Autoszómái a szarvasmarháéhoz, gonoszómái a juhokéhoz hasonlítanak.

A faj specifikus problémája azonban a szarvatlan-sággal kapcsolatos öröklődő fordított nem.

A szarvatlanság a többi kérődzőhöz hasonlóan dominánsan öröklődik (bár juhok esetében van recesszív változat is), autoszómális kromoszómához kötött tulajdonság és P-génje itt is az 1. kromoszómán, de a rokon fajoktól eltérő lókuszon található.

Az interszexualitás

Emlősökben az ivarszervek fejlődési rendellenességeit számos fajnál leírták, köztük az embereknél, a sertéseknél, a kecskéknél, a lovaknál, a kutyáknál, az egereknél, valamint az erszényeseknél is (Cribru és Chaffaux, 1990; Pailhoux et al., 2001a.; Kim és Kim, 2006).

Interszexualitás alatt tágabb értelemben a kromoszómális, a gonadális és a genitális és fenotípusos ivar, valamint a szexuális viselkedés közötti összhang megbomlását, eltéréseket, keveredéseket kialakulását értik, így magában foglalja a hermafroditizmusokat. A genitális rendellenes fejlődése minden emlős fajnál előfordulhat (Cribru és Chaffaux, 1990; Passello-Legrand és Mowat, 2004; Weng et al., 2005). Az interszexualitásra jellemző ivarszervi fejlődési rendellenességek, amelyeket hermaphroditizmusnak is nevezünk, változatos alapon jönnek létre. Az interszexuális állatok mindkét ivar jellemzőit hordozzák. Az ivarmirigyektől függően valódi hermafroditáknak vagy álhermafroditáknak nevezük őket (Howard és Bjorling, 1989).

A valódi hermafroditákban különböző kombinációkban mind a két gonádtípus megtalálható. Ezekben az egyedekben lehet here az egyik oldalon, míg a másik oldalon petefészek, illetve kapcsolódhat hozzájuk ovotestis (olyan gonád, amelyben mind a petefészkekre mind a herére jellemző szövet jelen van) (Hámori, 1983; Kai et al., 2003). A legismertebb a vegyesivarú ikerellésből született üszök nem-öröklődő freemartin-szindrómája, melyek terméketlenek. A freemartin-szindróma esetei juhban és kecskében sokkal ritkábban fordulnak elő (Marcum, 1974; BonDurant et al., 1980; Hámori, 1983). Besorolásuk szerint lehetnek:

- bilaterális (ovotestis mindkét oldalon),
- unilaterális (ovotestis az egyik oldalon és here vagy petefészek a másik oldalon),
- laterális (here az egyik, petefészek a másik oldalon).

Az álhermafroditák fenotípusos jellege és gonadális ivara között különbség van. Az álhermafroditák csak az egyik ivar gonádjával rendelkeznek, de a másodlagos nemi jellegüket és a külső ivarszerveiket tekintve a másik nemre hasonlítanak (Kennedy és Miller, 1993). Az álhermafroditáknak aszerint, hogy milyen küllemük és ivarmirigyük van, további két csoportra különíthetők el:

- nőtény álhermafroditák: XY ivari kromoszómák mellett hasúri heréjük, de női küllemük van; az XY-gonád dysgenesis kancákban gyakori;
- hím álhermafroditák: XX ivari kromoszómák mellett herékkel rendelkeznek (Howard és Bjorling, 1989; Del Amo et al., 2001).

A PIS mutáció

A termékenyítőképtelenség előfordulása a kecskéknél – különösen azokban az állományokban, ahol nagy figyelmet fordítanak a szarvatlan állatok létrehozására – indította el azokat a vizsgálatokat, melyek szerint kapcsolat van a szarvatlanság és a hermafroditák születése között.

Eaton és Simmons (1939) arra a megállapításra jutott, hogy a hermafroditizmus egyszerű recesszív öröklésmenetet követ. Asdell (1944) szerint csak a nőivarú állatokat érinti ez a rendellenesség, mivel a heterozigóta szülők utódainak a megoszlása 7 normális és 1 hermafrodita lesz. Ivararány szerint ez azt jelenti, hogy 4 hímivarú: 3 nőivarú: 1 álhermafrodita.

Szarvatlanságra homozigóta XX-kecskék esetében az ivarátfordulás, a PIS mutáció (Polled Intersex Syndrome) eredete napjainkig nem volt világos a mutáció összetettsége miatt, amely érinti a FOXL2 gén és több nemkódoló RNS átírását (Pailhoux et al., 2001b; Pannetier et al., 2012; Boulanger et al., 2014). A FOXL2 gén felelős a petefészek sejtjeinek kialakulásáért és működéséért, valamint az általa kódolt fehérje egy másik, Sox9 elnevezésű gén működését gátolja. A Sox9 gén a here sejtjeinek fejlődését serkenti. Amikor a FOXL2 gén gátolt, a Sox9 átveszi a hatalmat, és a petefészek sejtjeit heresejteké alakítja.

A PIS mutáció okozza a szarvak hiányát a heterozigóta (PIS^{+/}) és a homozigóta (PIS^{-/-}) állatokban mindkét ivarban (domináns tulajdonság), valamint a nőből hím irányú ivarátfordulást (recesszív, ivar által korlátozott jelleg) (Pailhoux et al., 2001a). Ezek a hímek

60, XX kariotípusúak és hím álhermafroditák, vagy valódi hermafroditák. Homozigóta szarvatlan nőivarú egyed nem létezik.

A PIS mutáció gátolja a FOXL2 gén expresszióját és három nem-kódoló RNS (PISRT1, PISRT2, PFOXic) transzkripcióját (Pannetier et al., 2005).

A kutatások arra utalnak, hogy a FOXL2 lehet a PIS lókuszt azonos génje, amely az ivarátfordulásért felelős, a nem-kódoló RNS-ek pedig a FOXL2 transzkripció szabályozásában vesznek részt (Pannetier et al., 2012).

Összehasonlítva más emlősállatokkal, mint pl. kutya vagy sertés, ahol gyakori az XX ivarátfordulás (Meyers-Wallen és Patterson, 1988; Pailhoux et al., 2001b), a fenotípusos megfigyelések alapján az ivarátfordulásos kecskék felénél nem található nemi kétivarúság (Ricordeau és Lauvergne, 1967). Eszerint a fenotípus szerint az ivarátfordulási hibák az XX PIS/egyedeknél már a nagyon korai magzati életben előfordulnak. Szarvatlanságra heterozigóta állatok párosításából származó magzatokat vizsgáltak. A magzatok kromoszomális ivarát PCR-rel határozták meg. A here morfológiai differenciálódása a megtermékenyítés utáni 36. napon indul meg a normál bakokban. Szövetteni differenciálódás az interszexuális egyedekben csak 4–5 nappal később figyelhető meg, mint a normális XY ivari kromoszómákkal rendelkező egyedekben. Ezt követően viszont az XX-es és az XY-os egyedeknek nagyon hasonlóak a herestrúktúráik egészen a megszületésig. Emellett a PIS mutáció elsősorban az ivarmirigyek sejtjeit befolyásolja. Genetikai szempontból ez a mutáció nem oka az SRY gén abnormális jelenlétének, hiányának. Korábbi tanulmányok bebizonyították, hogy az XX hímeiben nincsenek jelen Y-kromoszóma szekvenciák, beleértve az SRY gént (Pailhoux et al., 1994). Szatkowska et al. (2013) különböző korú ál- és valódi hermafrodita kecskék ivarmirigyeinek maszkulinizációját értékelték. A here sejtjeinek fejlődését serkentő gén (Sox9) az 1–3 hónapos kor közötti álhermafrodita gidákban is megtalálható, ugyanúgy, mint az azonos korú suta vagy szarvált XY kromoszómákkal rendelkező hímek esetében, ugyanakkor az álhermafroditák ivarmirigyeiben nem volt megfigyelhető ennek a génnek a transzkripció aktivitása. A gén expressziójának drasztikus csökkenése 12 hónapos korban már bekövetkezik az álhermafrodita egyedeknél, amely valószínűleg tükrözi a herében bekövetkező jelentős degeneratív változásokat.

A P-gén kívánatos hatása, a szarvatlanság már heterozigóta formában is érvényesül, míg a nem-kívánatos hatása csakis a szarvatlan bak \times szarvatlan anya párosításokból születő homozigóta XX-es utódokban mutatkozik meg (az utódok 12,5–25%-a hím álhermafrodita lesz, emiatt a fenotípusos ivararány is eltolódik). Mivel kevesebb nőivarú állat születik, így kevesebb egyed tudnak tenyészállatnak meghagyni, és mivel az elsődleges haszon a tej, a több bak a későbbiek folyamán termelés kiesést okoz.

Szarvatlan kecskefajta nincs, mivel a létrehozására megkezdett kísérletek a második generációtól egyre halmozódó hím álhermafroditák miatt kudarcba fulladtak.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A vizsgálat első lépésében kiválasztottuk azokat a bakokat, amelyeknek mindkét szülője szarvatlan. Ezekről a suta állatoktól (n=20) vért vettünk a vena jugularisból heparinos csövekbe.

Ezt követően a vérmintákból steril Pasteur-pipettával kb. 0,5 ml-t vittünk át a 3 ml tápfolyadékot tartalmazó tenyésztő csövekbe, amelyeket kívülről szorosan illeszkedő steril gumisapkával zártunk le. A csöveket termosztátba helyeztük, és 48 óráig vízszintes helyzetben 38–39 °C-on inkubáltuk. A 46. órában a tenyészeteket átvittük a steril fülkébe, és ott vinblasztint adtunk hozzájuk, ezután még 2 órára visszatettük a termosztátba. A vinblasztin a sejtciklus metafázisában állítja meg a sejtosztódást, azáltal, hogy tönkreteszi az osztódási orsót és így megakadályozza, hogy a mitózis befejeződjön. Ezáltal a vizsgált tenyészetben a metafázisok felszaporodnak, és a kromoszómák egységes képet mutatnak. A kromoszómák csak ebben az állapotukban figyelhetők meg egyesével fénymikroszkóp alatt.

Ezután a csöveket 1500-as fordulatszám mellett 10 percig centrifugáltuk. Az így keletkezett felülúszót pipettával leszívtuk, majd az üledéket 0,56%-os káliumklorid oldattal felengedtük és 20 perc szobahőmérsékleten való hipotóniás kezelés után ismét centrifugáltuk. A centrifugálás utáni felülúszót szintén leszívtuk.

A következő lépés a fixálás, amely metanol és 98%-os ecetsav 3:1 arányú elegyével történik.

Ezt követően Pasteur pipettával 2 csepp szuszpenziót cseppentettünk a mélyhűtőből kivett páras tárgylemezre. A preparátumokat levegőn megszáradtattuk, majd 7–10 percig Giemsa-val festettük. A festékből kivéve desztillált vízzel leöblítettük, és száradás után lefedtük a tárgylemezeket. Lefedéskor 2 csepp kanadabalszámot tettünk a tárgylemezre, majd ráhelyeztük a fedőlemezt.

A lefedett tárgylemezeket ezután mikroszkóp alatt vizsgáltuk és értékeltük. Olyan osztódásokat kerestünk, melyek jól értékelhetők, és ezeket lefényképeztük a mikroszkóphoz kapcsolt számítógép és a megfelelő szoftver (Cell[^]B, Cell[^]A software) segítségével.

EREDMÉNYEK, KÖVETKEZTETÉSEK

A vizsgált állatok között (n=20) három interszex egyed, egy valódi hermafrodita és két hím álhermafrodita bakot találtunk, az utóbbiak egyike egy fertőzés következtében fiatalon elpusztult.

Az álhermafrodita bak küllemileg sokkal inkább a nőivarra hasonlít. Egy azonos korú (1,5 éves), XY-os bakkal összehasonlítva az álhermafrodita feje szikárabb, vékonyabb, szőrzete finomabb, a teste nyúlankabb, a lábai pedig vékonyabbak. A heréi sokkal kisebbek, fejletlenebbek a normális fejlődésű bakokhoz viszonyítva. Nincs bak szaga és nem mutat érdeklődést az anyakecské iránt.

A valódi hermafrodita kecskének (1 éves) mindkét ivarra jellemző külső ivarszervei – péra és csikló mellett leszállt herék – vannak. Testalkatilag az XY-os bakokra hasonlít: széles fej, zömök test, erős lábak, durva szőrzet, de nincs ivari szaga.

A metafázisos osztódásokat elemezve megállapítottuk, hogy mindkét egyed esetében megtalálható mind a 60 kromoszóma. Egyik egyednél sem találtunk Y-kromoszómát, sem pedig többlet kromoszómákat.

A szarvatlanság kedvező tulajdonság, ugyanakkor a szarvatlan egyedek párosításából születendő utódok egy része (12,5–25%) hím-álhermafrodita lesz. Ennek egyik következménye a terméketlenség, a második és egyben legfontosabb következménye pedig, hogy mivel kevesebb nőivarú egyed születik, így kevesebb egyed tudnak meghagyni tenyészállatnak, és mivel az elsődleges haszon a tej, a több bak a későbbiek folyamán termelés kiesést okoz.

A gazdasági károk elkerülése érdekében a leggyorsabb módszer, ha a szarvatlan anyákat szarvált bakkal, míg a szarvált anyákat suta bakkal párosítjuk. Mindkét párosításból születni fognak suta gödölyék, ame-

lyeket továbbtenyésztésre meg lehet hagyni; és egyik esetben sem fognak interszexek születni (Budai et al., 2012).

A suta bakokon tenyésztésbe vétel előtt spermavizsgálatot lehet végezni, vagy az interszex egyedek korai kiszűrése érdekében már gida korban el lehet végezni egy kromoszóma vizsgálatot, vagy egy Y-kromoszóma specifikus PCR-rel meg lehet határozni a gidák ivarát. A kromoszóma-vizsgálat azonban munka- és időigényes, valamint a különböző kontaminációk miatt csak 95%-ban sikeres, viszont a freemartinizmus és más kromoszóma-rendellenességek (pl. centrikus fúziók) is felismerhetők vele. A limfocita-tenyészetekből végzett kromoszóma-preparálásnál olcsóbb, gyorsabb és biztosabb módszer a sterilítást nem igénylő DNS alapú diagnózis.

IRODALOM

- Asdell, S. A. (1944): The genetic sex of intersexual goats and probable linkage with the gene for hornlessness. *Science*. 99: 124.
- Basrur, P. K.–Stoltz, D. R. (1967): The Y chromosome of the goat. *J. Hered.* 48: 261–262.
- BonDurant, R. H.–McDonald, M. C.–Trommershausen-Bowling, A. (1980): Probable freemartinism in a goat. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 177: 1024–1025.
- Boulanger, L.–Pannetier, M.–Gall, L.–Allais-Bonnet, A.–Elzaïat, M.–Le Bourhis, D.–Daniel, N.–Richard, C.–Cotinet, C.–Ghyselinck, N. B.–Pailhoux, E. (2014): FOXL2 is a female sex-determining gene in the goat. *Current Biol.* 24: 404–408.
- Budai Cs.–Bihari R.–Németh T.–Kovács A. (2012): Ne párosíts szarvatlan kecskét szarvattal! Magyar Juhászat. *A Magyar Mezőgazdaság melléklete*. 21. 8: 6–8.
- Cribiu, E. P.–Chaffaux, S. (1990): Intersexuality in domestic mammals. *Reprod. Nutr. Dev.* 1: 51S–61S.
- Del Amo, A. N.–Luca, J. D.–Zufriategui, L.–Armocida, A.–Barbeito, C. G.–Gobello, C. (2001): Male pseudohermaphroditism in a dog: A case report. *Theriogenology*. 1: 1–11.
- Eaton, O. N.–Simmons, V. L. (1939): Hermaphroditism in milk goats. *J. Hered.* 30: 261–266.
- Gilbert, S. F. (2000): Chromosomal sex determination in mammals. *Developmental Biology*. 6th edition.
- Griffiths, A. J. F.–Wessler, S. R.–Lewontin, R. C.–Gelbart, W. M.–Suzuki, D. T.–Miller, J. H. (2000): *An Introduction to Genetic Analysis*. 7th edition. Publisher: W. H. Freeman.
- Hake, L.–O'Connor, C. (2008): Genetic mechanism of sex Determination. *Nature Education*. 1: 25.
- Hámori D. (1983): *Háziállatok öröklődő alkati hibái és betegségei*. Akadémia Kiadó. Budapest.
- Howard, P. E.–Bjorling, D. E. (1989): The intersex animal associated problems. *Problems in Veterinary Medicine*. 1: 74–84.
- Jost, A. (1953): Problems of fetal endocrinology: The gonadal and hypophyseal hormones. *Recent Prog. Horm. Res.* 8: 379–418.
- Kai, K.–Sato, N.–Watanabe, A.–Shiraiwa, K.–Sasano, H.–Furuhashi, K. (2003): Case report of rat true hermaphroditism: colocalization of oocytes and granulosa and Sertoli cells in the germinal cord. *Toxicologic Pathology*. 31: 290–294.
- Kennedy, P.–Miller, R. B. (1993): The female genital system. [In: Jubb, K. V. F. et al. (eds.) *Pathology of Domestic Animals*. 4th ed.] Academic Press Inc. San Diego. California. 348–357.
- Kim, K. S.–Kim, O. (2006): A hermaphrodite dog with bilateral ovotestes and pyometra. *J. Vet. Sci.* 7: 87–88.
- Makino, S. (1967): The chromosome complexes in goat (*Capra hircus*) and sheep (*Ovis aries*) and their relationship. *Cytologia*. 13: 39–54.
- Marcum, J. B. (1974): The freemartin syndrome. *Anim. Breed. Abstr.* 42: 227–242.
- Meyers-Wallen, V. N.–Patterson, D. F. (1988): XX sex reversal in the American cocker spaniel dog: phenotypic expression and inheritance. *Hum. Genet.* 80: 23–30.
- Pailhoux, E.–Cribiu, E. P.–Chaffaux, S.–Darre, R.–Fellous, M.–Cotinet, C. (1994): Molecular analysis of 60, XX pseudohermaphrodite polled goats for the presence of SRY and ZFY genes. *J. Reprod. Fertil.* 100: 491–496.
- Pailhoux, E.–Mandon-Pepin, B.–Cotinet, C. (2001b): Mammalian gonadal differentiation: the pig model. *Reproduction Suppl.* 58: 65–80.
- Pailhoux, E.–Parma, P.–Sundstrom, J.–Vigier, B.–Serval, N.–Kuopia, T.–Locatelli, A.–Pelliniemi, L. J.–Cotinet, C. (2001a): Time course of female-to-male sex reversal in 38, XX foetal and postnatal pigs. *Developmental Dynamics*. 222: 328–340.
- Pannetier, M.–Elzaïat, M.–Thépot, D.–Pailhoux, E. (2012): Telling the story of XX sex reversal in the goat: highlighting the sex-crossroad in domestic mammals. *Sex Dev.* 6: 33–45.
- Pannetier, M.–Renault, L.–Jolivet, G.–Cotinet, C.–Pailhoux, E. (2005): Ovarian-specific expression of a new gene regulated by the goat PIS region and transcribed by a FOXL2 bidirectional promoter. *Genomics*. 85: 715–726.
- Passello-Legrand, F.–Mowat, V. (2004): Two cases of spontaneous pseudohermaphroditism in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J. Vet. Med. A Physiology, Pathology, Clinical Medicine*. 51: 344–347.
- Ricordeau, G.–Lauvergne, J. J. (1967): Hypothèse génétique unique pour expliquer la présence d'intersexués, de mâles en excès et de mâles stériles en race caprine Saanen. *Ann. Zootechnol.* 16: 323–334.
- Shetty, S.–Griffin, D. K.–Marshall-Graves, J. A. (1999): Comparative painting reveals strong chromosome homology over 80 million years of bird evolution. *Chromosome Res.* 7: 289–295.
- Sinclair, A. H.–Berta, P.–Palmer, M. S.–Hawkins, J. R.–Griffiths, B. L.–Smith, M. J.–Foster, J. W.–Frischauf, A. M.–Lovell-Badge, R.–Goodfellow, P. N. (1990): A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*. 346: 240–244.

- Szatkowska, I.–Jedrzejczak, M.–Dybus, A.–Wiszniewska, B.–Udałac, J.–Zaborski, D.–Wójcika, J.–Stankiewicz, T. (2013): Histological, molecular and transcriptional analysis of PIS goats. *Small Rum. Res.* 116: 126–132.
- Waters, P. D.–Delbridge, M. L.–Deakin, J. E.–El-Mogharbel, N.–Kirby, P. J.–Carvalho-Silva, D. R. (2005): Autosomal location of genes from the conserved mammalian X in the platypus (*Ornithorhynchus anatinus*): implications for mammalian sex chromosome evolution. *Chromosome Res.* 13: 401–410.
- Weaver, B. A.–Silk, A. D.–Cleveland, D. W. (2006): Cell biology: nondisjunction, aneuploidy and tetraploidy. *Nature.* 442: E9–E10.
- Weng, Q.–Murase, T.–Asano, M.–Tsubota, T. (2005): Male pseudo-hermaphroditism in a raccoon dog (*Nyctereutes procynoides*). *J. Vet. Med. Sci.* 67: 603–605.

