

Détermination rapide du sexe chez des embryons de ragondin, *Myocastor coypus*, dès les premiers stades de gestation

Pascale Garcia-Meunier^{a*}, Laurence Pastout^b, Guillemette Chevalier^a, Christophe Guinet^b

^a Laboratoire de biologie et environnement marins, institut de la mer et du littoral, avenue Lazaret, port des Minimes, 17000 La Rochelle, France

^b CNRS-UPR 1934, centre d'études iologiques de Chizé, 79360 Beauvoir sur Niort, France

Reçu le 26 mai 2000 ; accepté le 18 décembre 2000

Présenté par Yvon Le Maho

Résumé – La détermination du sexe présente une importance considérable dans l'analyse de caractéristiques écologiques propres à certaines espèces non exploitées, notamment l'évolution des systèmes de reproduction et le contrôle du sex-ratio de la descendance par des avortements sélectifs, en fonction de divers paramètres maternels. Nous avons mis au point une méthode de sexage précoce (dès la deuxième semaine de gestation) des embryons de ragondins (*Myocastor coypus*), espèce qui présente en période estivale, un sex-ratio biaisé en faveur des mâles. Cette méthode repose sur l'amplification d'un fragment du gène *Sry* et utilise la combinaison de deux couples d'oligonucléotides dont l'un, autosomal, est un contrôle positif de la réaction d'amplification. L'étape classique d'extraction d'ADN est remplacée par une simple digestion du tissu embryonnaire en présence d'une résine échangeuse d'ions. Cette technique de sexage, simple, rapide, et relativement peu onéreuse, est donc particulièrement intéressante pour des études à l'échelle de la population. © 2001 Académie des sciences/Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS

gèneSry / détermination précoce du sexe / PCR / *Myocastor coypus*

Abstract – Fast and reliable sex identification in early stage of gestation in *myocastor coypus*. The early knowledge of the sex may be crucial for the understanding of many features of ecological and evolutive biology, including offspring sex-ratio adjustment and evolution of breeding systems. In coypu (*Myocastor coypus*), significant variation in birth sex-ratios can be observed and selective abortion of entire litters is one of the cited mechanisms. In order to determine the sex of coypu embryos in the earlier stages of gestation (second week), we developed a molecular technique based on PCR amplification of a region of the *Sry* gene. These method used the combination of two sets of primers: one specific of the Y-chromosome; the other one, autosomal, is a positive control for amplification. Because of the direct amplification of embryo lysate without DNA extraction, the present sexing technique is rapid, relatively simple and inexpensive, and presents numerous advantages for the study at population scale. © 2001 Académie des sciences/Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS

Sry* gene / early sex determination / PCR / *Myocastor coypus

*Correspondance et tirés à part.

Adresse e-mail : pgarciam@univ-lr.fr (P. Garcia-Meunier).

Abridged version

Numerous techniques have been recently developed to sex embryos of various species. Indeed, the early knowledge of the sex may be crucial not only for medical and agronomic purposes, but also for the understanding of many features of ecological and evolutive, including offspring sex-ratio adjustment, evolution of breeding systems, life history traits, dispersal and conservation genetics. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of Y chromosome fragment with suitable primers may be an interesting approach due to its rapidity, its relative simplicity and its reliability. However, in numerous natural or exploited populations, molecular markers are scarce or even not defined. Then the strategy is to use markers defined in an obvious target locus such as the sex determining region Y gene (*Sry*) located in chromosome Y which is ubiquitous in related species.

Growing numbers of studies have demonstrated significant variations in birth sex-ratios in non human mammals, in particular in coypu (*Myocastor coypus*) where selective abortion within a litter is one of the cited mechanisms. Anatomic sexing of the embryos are feasible only after the fourteenth week of gestation and there is no data concerning selective resorption and abortion in the earlier stages of gestation. We therefore developed a molecular technique based on PCR amplification of a Y-chromosome specific sequence for determining the sex of coypu embryos. Moreover, our technique sets us free from DNA extraction and allows sex identification directly from crush embryos.

Embryos were collected by hysterectomizing trapped and killed females, then they have been conserved at -20°C . Twenty five mg of each embryos, younger than 14 weeks, were transferred individually to 500 μL of the following buffer: Chelex 10 % (Chelex 100 resin), 15 μL proteinase K (Merck) 10 mg/mL. Samples were incubated 3 h at 55°C then shaken, followed by a 20-min incubation at 100°C , rapidly vortexed and centrifuged 5 min at 8 000 g. The control DNA was prepared in the same way using 25 mg of kidney extracted from adult males and females. Primers for PCR amplification of a 157-base-pair region of the *Sry* gene were chosen based on strong homology among mouse and rabbit sequences on the 3' end. The 5' upstream primer (*SRY-L*) was 5'-TGAACGCATTCA-TGGTGTGGT-3' and the 3' downstream primer (*SRY-H*) was 5'-AATCTCTGTGCCTCCTGGAA-3'. A second set of primers (12S-L 5'-AAACTGGGATTAGATACCCCATAT-3' and 12S-H 5'-GAGGGTGACGGGCGGTGTGT-3') amplify a 450-base-pair region of the RNA 12S both in male and female. We used it as a positive control for successful PCR. All PCR reactions were carried out in a MJResearch DNA Thermal Cycler with a heat lid. The amplifications were performed in the following condi-

tions: 1.5 mM MgCl_2 , 10 pmoles of each *SRY-L* and *SRY-H* primer, 1 pmole of each 12S-L and 12S-H primer, 200 mM dNTPs, 1 U Taq polymerase Goldstar (Eurogenetec) in a 25 μL reaction volume. 1 μL of embryo or adults tissue lysate were used as DNA template. The cycling conditions were 35 cycles of denaturation at 94°C (1 min), annealing at 58°C (1 min), and extension at 72°C (1 min). A final period of extension at 72°C was carried out for 5 min. PCR results were resolved after electrophoresis in 2 % agarose gels (Ultra-pure DNA-Grade agarose, Eurogenetec).

Our results are optimum with a 1/10 ratio of the two sets of primers. Under those conditions, our sexing method was tested with adult kidney lysates, male, female and embryo lysates, males and females older than 14 weeks, as template. All samples, adults and embryos, showed a 450-bp band representing the positive control but only the males, adults and embryos, had an additional 150-bp band due to the amplification of the *Sry* gene region. The amplifications were successful either using DNA extract on resin columns or embryo lysate.

Our method used the combination of two sets of primers. The first one is specific of the Y-chromosome and reveals the male embryos. The second one, autosomal, is a positive control for amplification and decreases the risk of concluding that an embryo is female when the PCR is unsuccessful. We have chosen to amplify a region of the *Sry* gene (Sex Determining Region Y) located on the Y-chromosome because this gene is the primary regulator of the genes responsible of the first steps of testis development. Its main role is to activate the differentiation of the undeveloped gonads present in the embryo into testicles. Moreover, the detection of *Sry* transcripts in preimplantational embryos as early as the two-cell stage in mouse may imply a role for *Sry* immediately after fertilization. Comparisons of *Sry* gene coding sequences in different species have shown a strong divergence rate at the terminal region of the *Sry* protein, suggesting a rapid evolution of the *Sry* sequences. Yet, this gene shows two conserved regions in Mammals: the coding region for the HMG box and a short sequence close to the transcription initiator on the human *Sry* gene. These phylogenetic conservations of a region have been exploited to define primers for the differential amplification of the *Sry* gene in a range of mammal species. However, despite the fact that numerous sets of primers have been published, they are not suited to all mammal species. We demonstrated here that the region of *Sry* gene, already described as strongly conserved between the mouse and the rabbit at the 3' end, is also conserved in the coypu. Then, we were able to determine the sex of coypu embryos from the second week of gestation onwards, especially by the addition of PCR

cycles, which could be used to increase product copy number in smaller embryos with a low template concentration for PCR. Also, the present sexing technique is reliable, rapid, relatively simple and inexpensive because of the direct amplification of embryo lysate without DNA extraction; it presents numerous advantages for the study at the population level. ecological and evolutive biology, including offspring sex-ratio adjustment and evolution of breeding systems.

In coypu (*Myocastor coypus*), significant variation in birth sex-ratios can be observed. According to Gosling's work, adaptative control of the sex-ratio as a function of the variation in a mother's nutrient reserves may exist all gestation long, and selective abortion of entire litters is one of the cited mechanisms. The knowledge of the sex-ratio in the earlier stages of gestation will allow us to test Gosling's hypothesis.

1. Introduction

De nombreuses techniques ont été développées ces dernières années pour sexer les embryons de différentes espèces [1]. En effet, si le besoin de connaître le sexe avant que le sexage anatomique ne soit possible s'est fait sentir dans un but médical ou agronomique, cette nécessité est également présente pour la compréhension de l'écologie et de l'évolution de nombreuses populations naturelles [2]. La détermination du sexe présente une importance considérable dans l'analyse de caractéristiques propres à certaines espèces, notamment la variabilité du sex-ratio de la descendance en fonction de divers paramètres [3–5], l'évolution des systèmes de reproduction [6], les traits d'histoire de vie ou les capacités de dispersion [7].

L'amplification par polymérisation en chaîne (PCR) d'un fragment du chromosome Y à l'aide de marqueurs moléculaires appropriés s'est déjà révélée particulièrement intéressante [8] du fait de sa rapidité, sa mise en œuvre relativement simple, et sa fiabilité. Ces qualités en ont donc fait une technique de choix pour des études sur les populations exploitées ou naturelles.

Malheureusement, dans le cas de ces dernières dont le génome est peu étudié, les marqueurs moléculaires connus sont rares, voire inexistant. La stratégie est alors de tester les marqueurs de gènes du chromosome Y mis au point à partir d'espèces proches, en espérant mettre en évidence la conservation phylogénétique de la région concernée [7, 9]. La difficulté majeure reste donc le choix du marqueur car la méthode consistant à distinguer les individus mâles des individus femelles grâce à l'amplification d'une région conservée du chromosome Y, montre également des limites de par la constitution même de ce chromosome dont certaines régions présentent des duplications autosomales [10–15]. La seconde difficulté provient de la contrainte statistique qui impose de tester des effectifs importants dans un temps et un budget raisonnables.

Plusieurs équipes [16, 17] ont pu observer un investissement maternel différentiel dans certaines espèces. Selon la théorie de Trivers et Willard [3], les femelles ont intérêt à investir en fonction de leurs ressources dans le sexe qui aura le meilleur accès à la reproduction et donc la dispersion la plus efficace de ses gènes.

Chez le ragondin (*Myocastor coypus*), ce phénomène se traduit en période estivale par un sex-ratio biaisé en faveur

des mâles [18]. Plusieurs mécanismes ont été suggérés tels qu'un sex-ratio biaisé dès la conception, une résorption partielle des embryons en proportion variable ou des avortements sélectifs à différents stades de la gestation, sur la base d'un sexage anatomique des embryons réalisé à partir de la quatorzième semaine de gestation. Nous nous proposons de mettre au point une méthode de sexage précoce des embryons par amplification d'un fragment de chromosome Y. Ainsi nous pourrions couvrir les premières semaines de gestation et suivre l'évolution de la taille, de la portée et du sex-ratio en fonction d'un certain nombre de paramètres écologiques et maternels, tout au long de la gestation. La mise au point de cette technique permettra de tester les hypothèses émises par Gosling [18].

Cette méthode présente de plus l'avantage d'occulter l'étape d'extraction d'ADN et de permettre l'identification du sexe directement à partir de lysats d'embryons.

2. Matériel et méthodes

2.1. Échantillons

Les embryons, tous issus de femelles gestantes prélevées en milieu naturel et sacrifiées dans le cadre d'une campagne de régulation de population, sont extraits des utérus et conservés à -20°C . L'âge des embryons est estimé grâce à la relation établie par Newson entre leur âge et leur masse [19]. Les individus dont l'âge est compris entre 2 et 14 semaines, non sexables anatomiquement, ont été traités selon le protocole modifié d'Estoup [20] : environ 25 mg de chacun des embryons sont prélevés et plongés dans un tube contenant 500 μL d'une solution de Chelex à 10 % (Biorad, Chelex 100 resin) et 15 μL protéinase K (Merck) à 10 mg/mL. Les échantillons sont incubés 3 h à 55°C , puis placés à 100°C pendant 20 min, rapidement vortexés et centrifugés 5 min à 8 000 g afin d'éliminer la résine. 1 μL du surnageant est prélevé et destiné à l'amplification in vitro.

L'ADN des témoins adultes et des embryons âgés de plus de 14 semaines sexables anatomiquement, a été préparé selon le même protocole, à partir d'un fragment d'environ 25 mg de tissu rénal.

Nous avons testé avec notre technique un total de 30 mâles adultes, 150 femelles adultes et 1 452 embryons parmi lesquels 496 étaient sexables anatomiquement.

2.2. Choix des amorces

Deux couples d'amorces ont été utilisés pour sexer les embryons. Le premier, (Sry-L: 5'-TGAACGCATTCATGGTGTGGT-3' et Sry-H: 5'-AATCTCTGTGCCTCCTG-GAA-3') qui amplifie un fragment de 157 paires de bases du gène *Sry* porté par le chromosome Y, a été sélectionné en raison de la forte homologie observée entre la souris et le lapin à l'extrémité 3' [8]. Le second couple de marqueurs (12S-L: 5'-AAACTGGGATTAGATACCCACTAT-3' et 12S-H: 5'-GAGGGTGACGGCGGTGTGT-3', défini à partir des travaux de Kocher [21]), amplifie un fragment de 450 paires de bases de l'ARN 12S chez les mâles et les femelles et constitue un témoin de succès de l'amplification.

2.3. Conditions d'amplification

Les réactions d'amplification ont été produites dans un thermocycleur de marque MJResearch avec couvercle chauffant.

Le volume réactionnel final de 25 μ L contenait 1 μ L de lysat d'embryons ou de tissu rénal adulte pour les témoins, 1.5 mM MgCl₂, 10 pmoles de chacune des amorces Sry-L et Sry-H, 1 pmole de chacune des amorces 12S-L et 12S-H, 200 μ M dNTPs, 1 U Taq polymérase Goldstar (Eurogenetec). Les échantillons ont subi à 35 reprises les étapes suivantes : 1 min de dénaturation à 94 °C, 1 min de réassociation à 55 °C, et 1 min d'élongation à 72 °C.

Une étape finale de 5 min d'élongation à 72 °C conclut la réaction d'amplification. Les résultats sont visualisés après électrophorèse sur gel d'agarose à 2 % (Ultra-pure DNA-Grade agarose, Eurogenetec).

3. Résultats

Sous ces conditions, nous avons testé des adultes mâles et femelles, des embryons sexables anatomiquement et des embryons dont l'âge est compris entre 2 et 14 semaines. Les résultats de PCR sont optimum avec un rapport de 1 à 10 entre les deux couples d'amorces. Parmi les 30 mâles et 150 femelles adultes testés, 26 mâles et 128 femelles ont répondu à l'amplification et présenté la bande de contrôle de 450 paires de bases. Sur 1 452 embryons prélevés, 496 ont été sexés anatomiquement et 956 selon notre protocole. La réaction de polymérisation en chaîne a échoué pour 52 d'entre eux. Nous avons analysé un total de 184 portées et retenu celles dont l'ensemble des embryons présentait la bande de contrôle de 450 bases, soient 119 portées issues des 128 femelles adultes préalablement testées.

Parmi les individus ayant répondu à l'amplification, seuls les mâles, adultes et embryons ont montré une amplification de 150 paires de bases du gène *Sry* (séquence présentée figure 1). Chez les adultes, l'expérience a été conduite en parallèle à partir d'ADN extrait sur colonne de résine et de lysat de tissu traité au Chelex.

Nos résultats (voir figure 1) démontrent ici l'inutilité d'une étape d'extraction d'ADN fastidieuse et coûteuse.

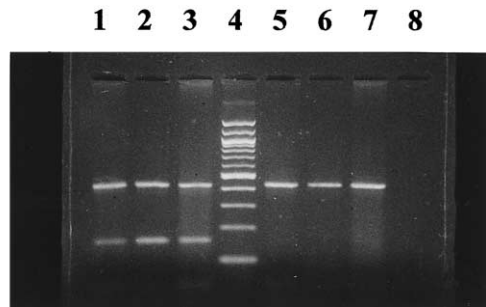


Figure 1. Détermination du sexe chez *Myocastor coypu* par amplification in vitro d'un fragment de chromosome Y.

1 : témoin mâle adulte. 2 : embryon mâle de 17 semaines sexé anatomiquement. 3 : embryon mâle de 5 semaines. 4 : marqueur de poids moléculaire (gamme de 100 à 1 200 pb). 5 : témoin femelle adulte. 6 : embryon femelle de 18 semaines sexé anatomiquement. 7 : embryon femelle de 3 semaines. 8 : contrôle négatif de la réaction PCR.

4. Discussion et Conclusion

De nombreuses méthodes de sexage ont été décrites notamment chez l'homme et les espèces animales exploitées. La nôtre repose sur l'amplification d'un fragment du chromosome Y et utilise la combinaison de deux couples d'oligonucléotides. L'un est spécifique du chromosome Y et permet de révéler les embryons mâles ; l'autre, autosomal, est un contrôle positif de la réaction d'amplification.

La région étudiée du chromosome Y est un fragment du gène *Sry* (sex-determining region Y) [22]. *Sry* est le régulateur primaire des gènes responsables des premières étapes du développement testiculaire [23]. Ainsi la détection de transcrits de *Sry* a été décrite dès le stade « 2 cellules » chez des embryons de souris [24], ce qui démontre le rôle essentiel de *Sry* dès la conception. La comparaison des séquences codantes de ce gène montre un fort taux de divergence au niveau des régions terminales de la protéine *Sry* dans les différentes espèces [25 ; 26], ce qui suggère une rapide évolution des séquences de *Sry*. Cependant, ce gène présente deux régions très conservées chez les mammifères, le motif codant HMG box et une courte séquence proche de l'initiateur de transcription chez le *Sry* humain [27]. La conservation phylogénétique de régions données du gène *Sry* a été exploitée par de nombreux auteurs pour définir des couples d'oligonucléotides susceptibles d'amplifier des régions du chromosome Y chez un certain nombre d'espèces. Pourtant et bien que de nombreux couples d'oligonucléotides amplifiant une région du *Sry* aient été publiés [28], ils ne sont pas adaptés à toutes les espèces de mammifères. Nous avons montré que la région du gène *Sry* choisie en raison de la forte homologie observée entre la souris et le lapin à l'extrémité 3' [8] est également conservée chez le ragondin.

D'autres gènes fonctionnels ont également été localisés sur le chromosome Y et notamment les gènes *Zfy1* et *Zfy2* codant pour des protéines à doigt de zinc [11]. Cependant, chez la souris domestique, il a été montré que le gène *Zfy*

constitue une famille multigénique de 4 copies [15] : deux sur le chromosome Y (Zfy1 et Zfy2), une sur le chromosome X (Zfx) et un pseudogène rétroposé sur le chromosome 10 (Zfa). De plus, l'expression différentielle de ces deux gènes chez le fœtus et l'adulte [15] ne désigne pas Zfy comme un candidat fiable pour le sexage des embryons.

L'étape classique d'extraction d'ADN, préambule à toute amplification, est ici remplacée par une simple digestion du tissu embryonnaire en présence d'une résine échangeuse d'ions, ce qui diminue significativement la durée et le coût du sexage. Cette technique de sexage, simple, rapide, fiable et relativement peu onéreuse, se révèle donc particulièrement intéressante pour des études à l'échelle de la population. Elle permettra notamment chez le ragon-

din, de connaître le sex-ratio des portées dès les stades les plus précoces de la gestation. Nous testerons ainsi les hypothèses de Gosling qui stipule que le sex-ratio évolue au cours de la gestation, à la suite d'épisodes de résorption et d'avortement sélectif d'embryons de ragondins, selon leur sexe et les conditions environnementales supportées par les femelles gestantes [18].

Remerciements. Nous remercions le personnel de la Fédération départementale des groupements de défense contre les ennemis des cultures des Deux-Sèvres, et les chasseurs de Charente-Maritime pour la collecte des animaux, ainsi que le Syndicat mixte du Parc Interrégional du Marais Poitevin pour le co-financement des réactifs nécessaires à ces analyses.

Références

- [1] Bondioli K., Embryo sexing : A review of current techniques and their potential for commercial application in livestock production, *J. Anim. Sci.* 70 (suppl.2) (1995) 19.
- [2] Clutton-Brock T.H., Sex ratio variation in birds, *Ibis* 128 (1986) 317–329.
- [3] Trivers R.L., Willard D.E., Natural selection of parental ability to vary the sex ratio of offspring, *Science* 179 (1973) 90–92.
- [4] Burley N., Sex ratio manipulation and selection for attractiveness, *Science* 211 (1981) 721–722.
- [5] Chamov E.L., *The theory of sex allocation*, Princeton University Press, 1982.
- [6] Emlen S.T., The evolution of helping. I. An ecological constraints model, *Am. Nat.* 119 (1982) 29–39.
- [7] Griffiths R., Tiwari B., The isolation of molecular genetic markers for the identification of sex, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90 (1995) 8324–8326.
- [8] Pomp D., Good B., Geisert R., Corbin C., Conley A., Sex identification in mammals with Polymerase Chain Reaction and its use to examine sex effects on diameter of Day-10 or -11 Pig embryos, *J. Anim. Sci.* 73 (1995) 1408–1415.
- [9] Tiersch T.R., Studies on the phylogenetic conservation of the *Sry* gene, *Hum. Genet.* 87 (5) (1991) 571–573.
- [10] Eicher E., Hutchison K., Phillips S., Tucker P., Lee B., A repeated segment on the Y chromosome is composed of retroviral-related, Y-enriched and Y-specific sequences, *Genetics* 122 (1989) 181–192.
- [11] Page D., Moster R., Simpson E., Fisher E., Mardon G., Pollack J., McGilluray B., De la Chapelle A., Brown L., The sex-determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein, *Cell* 51 (1987) 1091–1104.
- [12] Bull J., Hillis M., O'Steen S., Mammalian ZFY sequences exist in reptiles regardless of sex-determining mechanism, *Science* 242 (1989) 567–569.
- [13] DiLella A., Page D., Smith R., A bird zinc-finger protein closely related to ZFY, *New Biologist* 2 (1990) 49–56.
- [14] Valleley E., Muller U., Ferguson M., Sharpe P., Cloning and expression analysis of two ZFY-related zinc finger genes from *Alligator mississippiensis*, a specie with temperature-dependant sex determination, *Gene* 119 (1992) 221–228.
- [15] Nagamine C., Kamin C., Kozak C., Lau Y., Chromosome mapping and expression of a putative testis determining gene in mouse, *Science* 243 (1989) 80–83.
- [16] Williams G.C., The question of adaptative sex ratio in outcrossed vertebrates, *Proc. R. Soc. Lon. B. Biol. Sci.* 205 (1979) 567–580.
- [17] Harmsen R.H., Cooke F., Binomial sex ratio distribution in the Lesser Snow Goose: A theoretical enigma, *Am. Nat.* 121 (1983) 1–8.
- [18] Gosling, Selective abortion of entire litters in the coypu : Adaptive control of offspring production in relation to quality and sex, *Am. Nat.* 127 (1986) 772–795.
- [19] Newson R.M., Reproduction in the feral coypu (*Myocastor coypus*), *Symposia Zool. Soc.* 15 (1966) 324–334.
- [20] Estoup A., Largiadér C., Perrot E., Chourrout D., Rapid one-tube DNA extraction for reliable PCR detection of fish polymorphic markers and transgenes, *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 5 (4) (1996) 295–298.
- [21] Kocher T., Thomas W., Meyer A., Edwards S., Pääbo S., Villablanca S., Wilson A., Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 6196–6200.
- [22] Sinclair A., Berta M., Palmer J., Hawkins J., Griffith B., Smith M., Foster J., Frischauf A., Lovell-Badge R., Goodfellow P., A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA binding motif, *Nature* 346 (1990) 240–244.
- [23] Koopman P., Gubbay J., Vivian N., Goodfellow P., Lovell-Badge R., Male development of chromosomally female mice transgenic for *Sry*, *Nature* 351 (1991) 117–121.
- [24] Zwingman T., Erickson R., Boyer T., Asangla A., Transcription of the sex-determining region genes *Sry* and *Zfy* in the mouse preimplantation embryo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 814–817.
- [25] Daneau I., Houde A., Ethier J., Lussier J., Silversides D., Bovine *Sry* gene locus: cloning and testicular expression, *Biol. Reprod.* 52 (1995) 591–599.
- [26] Payen E., Cotinot C., Sequence evolution of *Sry* gene within Bovidae family, *Mamm. Genome* 5 (1994) 723–725.
- [27] Margarit E., Guillèn A., Rebordosa C., Vidal-Taboada J., Sanchez M., Ballest F., Oliva R., Identification of conserved potentially regulatory sequences of the *Sry* gene from 10 different species of mammals, *Biochem. Biophys. Res. Com.* 245 (1998) 370–377.
- [28] Payen E., Cotinot C., Comparative HMG-box sequences of the *Sry* gene between sheep, cattle and goats, *Nucleic Acids Research* 21 (1993) 2772.