

黄鳝卵巢初次发育成熟及相关基因表达分析

何 智^{1,2}, 李依雪¹, 张碧鱼¹, 张为民¹, 张利红^{1*}

(1. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275;

2. 四川农业大学动物科技学院, 四川 雅安 625014)

摘要:为探讨黄鳝卵巢发育规律,观察了实验室养殖条件下黄鳝卵巢初次性成熟过程,采用定量 PCR 分析了 *gdf 9* (growth differentiation factor 9)、*cyp19a1a* (P-450 aromatase)、*amh* (anti-Müllerian hormone) 和 *amhrII* (anti-Müllerian hormone type II receptor) 基因表达水平。结果显示,4 至 9 月龄黄鳝卵巢中卵母细胞处于初级生长期,胞质中嗜碱性巴尔比尼小体数量先增后减,形状由点变为大团块状,后又缩小。10 月龄时,黄鳝卵巢青春期启动,进入次级生长期;部分卵母细胞出现皮质小泡,巴尔比尼小体消失或残存为点状。1 龄时,卵巢中卵母细胞生发泡偏位或消失,达到成熟状态。卵巢中 *gdf 9* 表达水平在 4 至 12 月龄都较高,变化不明显;*cyp19a1a*、*amh* 和 *amhrII* 表达变化趋势类似:从 4 月至 7 月龄上升,8 月龄下降,10 月龄又上升。研究表明,实验室养殖条件下,黄鳝卵巢 10 月龄左右启动青春期,1 龄左右可达性成熟;*cyp19a1a*、*amh* 和 *amhrII* 表达可能与卵巢青春期启动相关。

关键词:黄鳝; 卵巢发育; 青春期; 功能基因

中图分类号: Q 175; S 917.4

文献标志码: A

黄鳝 (*Monopterus albus*), 属于硬骨鱼纲 (Osteichthyes) 合鳃目 (Synbranchiformes)、合鳃科 (Symbranchidae)、黄鳝属 (*Monopterus*), 是一种雌性先熟、雌雄同体的性逆转鱼类, 具有较大的药用和食用价值。近年来, 黄鳝在我国安徽、湖北、湖南和江西等地广泛养殖, 但由于其规模化人工繁殖技术尚未突破, 黄鳝养殖苗种目前仍依赖捕捞野生资源, 这不仅造成自然黄鳝资源的枯竭, 同时也影响到黄鳝人工养殖业的可持续发展。研究黄鳝卵巢分化发育规律及其调节机制, 将为解决黄鳝规模化人工繁育问题提供重要的理论基础。

多年来, 我国学者对黄鳝卵巢分期和周年发育变化进行了较细致的研究^[1-3]。作为雌性先熟的性逆转鱼类, 黄鳝性腺首先发育为卵巢^[4-5], 但有关黄鳝卵巢青春期发育启动的时间点还未见相关报道。本文通过在实验室条件下养殖同一批黄鳝仔鱼至性成熟, 对黄鳝卵巢初次发育成熟的组织学变化进行了连续观察, 发

现 10 月龄黄鳝卵巢开始启动青春期发育, 1 龄黄鳝可达到性成熟; 同时发现生殖相关功能基因 *cyp19a1a*、*amh* 和 *amhrII* 的表达变化与黄鳝青春期出现密切相关。

1 材料与方法

1.1 实验黄鳝的饲养与样品采集

实验用鱼为 2010 年 6 月孵出的同一批次的黄鳝仔鱼, 来自四川简阳大众养殖责任有限公司。实验用鱼运回广州后, 在实验室内置于直径为 80 cm 的塑料盆中, 在自然光照和温度下饲养, 投喂摇蚊幼虫, 并根据生长情况适时分盆, 控制养殖密度^[6]。出膜 4 个月后, 每月采集样品 1 次, 每次 6~12 尾。取样时测量黄鳝的体长和体质量。黄鳝性腺呈线状, 取出后从前至后切分成大体相等的 4 段, 第 1、3 段性腺样品采用液氮冻存, 以备基因表达分析; 第 2、4 段性腺样品采用包恩氏液固定 24 h 后, 置于 70% 的酒精中, 用于卵巢组织学

收稿日期: 2012-12-06 修回日期: 2013-01-13

资助项目: 国家自然科学基金项目 (31072197, 31172088)

通信作者: 张利红, E-mail: zhlih@mail.sysu.edu.cn

观察。

1.2 黄鳝卵巢石蜡切片制作与观察

对包恩氏液固定的黄鳝卵巢组织进行常规的石蜡切片制作,切片厚度为 6 μm,H. E 染色,中性树胶封片后进行组织学观察和拍照 (Nikon, E800)。

1.3 黄鳝卵巢 RNA 提取和 cDNA 模板制备

按照 Trizol Reagent(Invitrogen)操作说明,提取黄鳝卵巢组织的总 RNA,通过 1% 的琼脂糖电泳分析 RNA 的完整性,紫外分光光度计测定样品 RNA 浓度。cDNA 模板的制备参照 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit(Fermentas)说明书进行,并应用引物 β -actinF1/ β -actinR1,PCR 扩增黄鳝 β -actin 基因 (AY647143) 来验证反转录是否成功(表 1)。

表 1 所使用的定量 PCR 引物序列
Tab.1 Sequences of oligonucleotide primers for Real-time PCR

引物名称 primer name	引物序列(5'-3') primer sequence
β -actinF1	CGTACCACCGGAATTGTCA
β -actinR1	GTACCACCAGACAGCACAG
EamhqF	CTCTCAGTGTGCGTGATTGTGT
EamhqR	TGCGATAGTCGTCTGTGGTTTC
EamhrQF	GCAACACTGGTGGCTGATTCT
EamhrQF	GCAACACTGGTGGCTGATTCT
β -actinF2	GCGTGACATCAAGGAGAAGC
β -actinR2	CTCTGGGCAACGGAACCTCT
Cyp19a1F6	CATACTCAGCAGGTCATCAGCG
Cyp19a1R6	TCTCATTGACAGGTACACCA
eGDF9F6	ATCTACAACACACTCCGACTGA
eGDF9R6	TTGTGTCCAAATCTCTCTCAG

1.4 Real-time PCR 分析黄鳝卵巢中 *gdf 9*、*cyp19a1a*、*amh* 和 *amhrII* 基因表达水平

本文建立了分析黄鳝卵巢中 *gdf 9*、*cyp19a1a*、*amh* 和 *amhrII* 基因表达水平的定量 PCR 方法。使用引物 eGDF9F6/eGDF9R6 扩增 *gdf 9* (JQ283679),EamhqF/EamhqR 扩增 *amh*^[7]; EamhrQF/EamhrQR 扩增 *amhrII*^[8]; Cyp19a1F6/Cyp19a1R6 扩增 *cyp19a1a* (EU252487); β -actinF2/ β -actinR2 扩增 β -actin (AY647143)。所用引物由上海英骏生物技术有限公司合成,序列

见表 1。定量 PCR 仪为 IQ5 (Bio-rad, California, USA);反应体系:cDNA 模板 1.0 μL;正向引物 (10 μmol/L)0.4 μL;反向引物 (10 μmol/L)0.4 μL;2 × SYBR Green Master Mix (TOYOBO, Osaka, Japan)10.0 μL;H₂O 8.2 μL。扩增条件:95 ℃,1 min;95 ℃,30 s;58 ℃,15 s;72 ℃,15 s;72 ℃,15 s;82 ℃,15 s;40 个循环。每个循环最后一步 82 ℃时收集信号;扩增结束后,分析溶解曲线,用 IQ5 软件分析结果。同时,取 3 μL PCR 产物于 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,进一步确定 PCR 扩增的可靠性。

通过构建标准曲线对基因表达水平进行相对定量分析。以 10 倍梯度稀释的含目的片段的质粒 (10¹ ~ 10⁸ 拷贝)为模板进行 PCR 扩增,分别获得内参基因和目的基因的标准曲线。标准曲线相关系数大于 0.95,PCR 扩增效率大于 85%。依据相应的标准曲线,样品中目的基因拷贝数 (*C*_{目的基因})和内参基因拷贝数 (*C*_{内参基因})由 IQ5 软件计算出。使用 *C*_{目的基因}/*C*_{内参基因} 来表示样品中目的基因相对表达量。

1.5 数据处理

基因表达水平数据表示为平均值 ± 标准误 (mean ± SE)。采用 SPSS 统计软件进行单因素方差分析和 Tukey 多重检验,当 *P* < 0.05 时认为差异显著。

2 结果

2.1 实验室养殖条件下黄鳝的生长

实验室养殖条件下,4 至 12 月龄 (2010 年 10 月至 2011 年 6 月)黄鳝的体长增加了 3 倍左右,体质量增加近 15 倍 (图 1)。

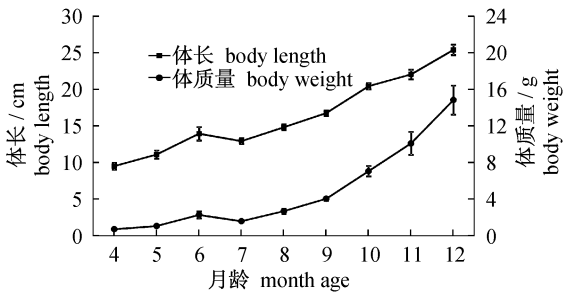


图 1 实验室养殖条件下黄鳝体长和体重变化
Fig.1 The growth in body length and body weight of ricefield eels under laboratory conditions

2.2 黄鳝卵巢初次发育成熟的组织学观察

4 月龄(当年 10 月):黄鳝卵巢外观透明,卵粒不明显。H. E 染色组织切片中,大部分卵母细胞胞质着色深,具有较强的嗜碱性;卵母细胞卵圆形,长径 $15.5 \sim 43.5 \mu\text{m}$,短径 $10.7 \sim 33.8 \mu\text{m}$;核大多为近圆形,染色质呈网状,嗜碱性的核仁位于核膜周边(图版-1)。卵母细胞胞质中出现点状的巴尔比尼小体。此时的卵母细胞可能已进入第一次减数分裂的双线期,处于核仁外周阶段的初级生长期。卵母细胞外周滤泡细胞层不明显。此外,生殖褶靠近生殖腺囊壁区域存在一些形态较小、嗜碱性较弱的卵母细胞。

5 月龄(当年 11 月):黄鳝卵巢中卵母细胞卵圆形,长径 $7.60 \sim 49.1 \mu\text{m}$,短径 $5.9 \sim 38.0 \mu\text{m}$;部分卵母细胞的胞质开始浓缩,巴尔比尼小体团块状,其周围出现空腔(图版-2);卵母细胞外的滤泡细胞单层,卵母细胞仍处于初级生长期。生殖褶中仍存在形态较小、嗜碱性较弱的卵母细胞。

6 月龄(当年 12 月):黄鳝卵巢中初级生长期卵母细胞长径 $21.1 \sim 57.8 \mu\text{m}$,短径 $17.8 \sim 48.8 \mu\text{m}$,胞质着色进一步加深,具有强嗜碱性,巴尔比尼小体明显(图版-3)。

7 月龄(次年 1 月)和 8 月龄(次年 2 月):黄鳝初级生长期卵母细胞长径 $8.9 \sim 54.4 \mu\text{m}$,短径 $6.8 \sim 42.0 \mu\text{m}$,胞质浓缩加剧。绝大部分卵母细胞中巴尔比尼小体围绕细胞核分布,其周围空腔明显(图版-4,5)。

9 月龄(次年 3 月):黄鳝卵巢中大部分卵母细胞形状不规则,细胞核近圆形,胞质着色变浅,嗜碱性减弱。卵母细胞中巴尔比尼小体数量明显减少,但大多数卵母细胞还残留有巴尔比尼小体。生殖褶靠近生殖腺囊壁区域处的卵母细胞较小,生殖褶中间部的卵母细胞较大(图版-6)。

10 月龄(次年 4 月):黄鳝卵巢中可见白色卵粒。H. E 染色组织切片中,卵母细胞长径 $25.3 \sim 93.3 \mu\text{m}$,短径 $17.3 \sim 81.0 \mu\text{m}$,胞质弱嗜碱性,巴尔比尼小体消失或呈点状。卵巢中大部分卵母细胞仍维持初级生长期阶段。位于生殖褶中间部的

部分卵母细胞发育较快,胞质中出现皮质小泡,表明卵黄开始形成,进入次级生长期,同时,卵母细胞外的滤泡细胞开始分化为颗粒细胞和膜细胞(图版-7)。这些形态特征表明黄鳝卵巢青春期开始启动。但是,生殖褶靠近生殖腺囊壁区域的卵母细胞发育较慢,部分卵母细胞仍处于初级生长期。

11 月龄(次年 5 月):黄鳝卵巢中卵母细胞体积变大,长径 $17.3 \sim 114.0 \mu\text{m}$,短径 $13.3 \sim 89.3 \mu\text{m}$ 。大部分卵母细胞中出现皮质小泡,胞质中未观察到巴尔比尼小体。透明带开始在皮质小泡期卵母细胞中出现,染色呈浅粉红色或不着色呈透明状(图版-8)。卵母细胞发育不同步,靠近生殖褶与生殖腺囊壁结合部位,卵母细胞大多仍维持在初级生长期阶段。

12 月龄(次年 6 月):黄鳝卵巢体积明显膨胀,卵巢呈棕黄色或浅黄色。H. E 染色组织切片中,卵母细胞已进入卵黄生成期,长径达 $122.0 \sim 1609.8 \mu\text{m}$,短径 $60.9 \sim 1341.5 \mu\text{m}$,胞质中充满卵黄颗粒。部分个体(约 20%)的卵巢中充满了卵黄生成晚期的卵母细胞,卵黄成块状,呈弱嗜酸性反应,染色呈深紫红色,生发泡(germinal vesicle)已偏位或消失(图版-9),透明带明显增厚,滤泡细胞层中颗粒细胞和膜细胞明显,卵母细胞达到成熟状态。在生殖褶靠近生殖腺囊壁区域,仍可见部分初级生长期和皮质小泡期卵母细胞。

2.3 黄鳝卵巢初次发育成熟过程中 *gdf 9*, *cyp19a1a*, *amh*, 和 *amhrII* 基因表达变化

应用建立的 Real-time PCR 方法,检测了黄鳝卵巢初次发育成熟过程中 *gdf 9*、*cyp19a1a*、*amh* 和 *amhrII* 的表达水平(图 2),结果表明:在 4 至 12 月龄黄鳝卵巢中,*gdf 9* 一直处于较高的表达水平,且无明显变化(图 2-a);*cyp19a1a* 的表达从 4 至 7 月龄明显升高,8 月龄时表达量下降,此后在 9 月和 10 月龄时呈现上升的趋势,随后又有所下降(图 2-b)。*amh* 和 *amhrII* 在黄鳝卵巢初次发育成熟过程中表达变化趋势基本一致:从 4 月龄到 7 月龄明显升高,在 8 月和 9 月龄时表达量下降,但在 10 月龄时表达量又升高(图 2-c, d)。

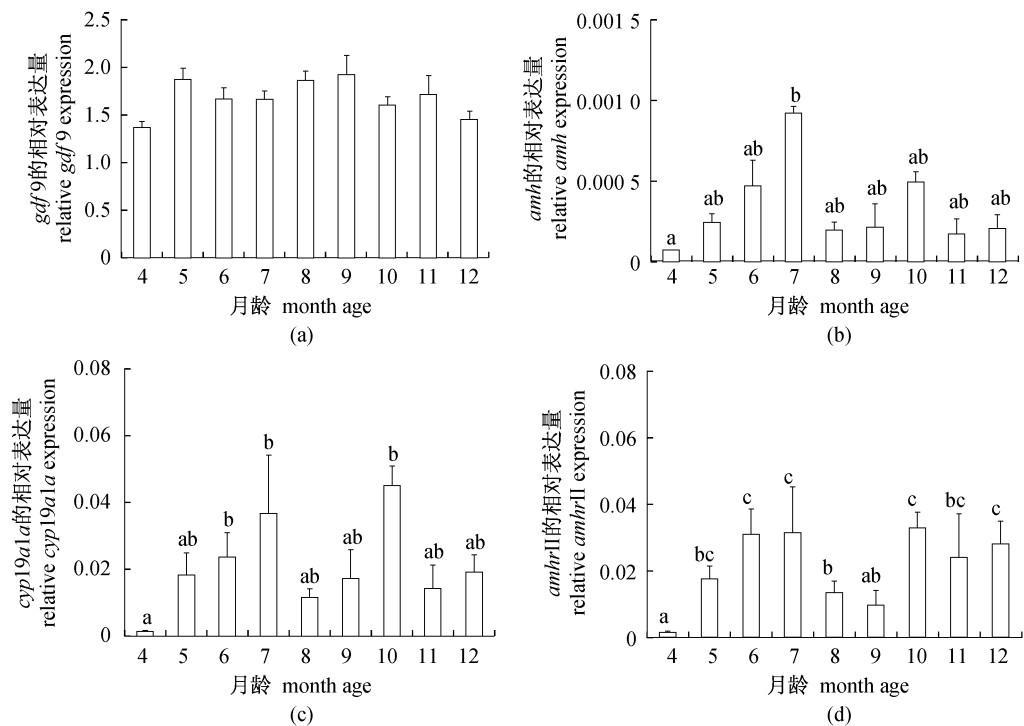


图2 Real-time PCR 分析黄鳝卵巢初次发育成熟过程中生殖相关功能基因表达
(a) *gdf9*, (b) *amh*, (c) *cyp19a1a*, (d) *amhrII*。结果表示为平均值 $\pm$ 标准误 ($n = 5$)。图中不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig.2 Real-time PCR analysis of some reproduction-related functional genes during the initial ovarian development
(a) *gdf9*, (b) *amh*, (c) *cyp19a1a*, (d) *amhrII*. The results are presented as mean $\pm$ SE ($n = 5$). Means marked with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

3 讨论

3.1 黄鳝青春期为性成熟年龄

动物青春期是指其第一次性成熟的发育过程。在鱼类中,青春期的启动是以雄性精巢中精母细胞的首次出现或雌性卵巢中卵母细胞卵黄开始生成为标志^[9]。研究鱼类青春期的启动不仅对探讨鱼类繁殖调控机制有重要理论意义,而且对于鱼类的养殖和苗种繁育也有应用价值。

已有报道描述了黄鳝卵巢发育过程^[4-5],但黄鳝卵巢青春期的启动时间进程并不清楚。本文在实验室养殖条件下,跟踪观察了同一批次黄鳝仔鱼的卵巢发育过程的组织学变化,结果表明:10月龄左右,黄鳝卵巢中部分卵母细胞开始出现皮质小泡,进入卵黄生成前期,启动了卵黄生成过程;同时,卵母细胞外的滤泡细胞层开始分化产生颗粒细胞和膜细胞,推测此时黄鳝卵巢的青春期已开始启动。

在实验室养殖条件下,黄鳝卵巢中卵母细胞在青春期的启动前处于初级生长期,胞质具有较强

的嗜碱性;在10月龄青春期的启动后卵巢进入次级生长期,卵母细胞开始卵黄生成;在12月龄时部分黄鳝卵巢中卵母细胞进入卵黄发生晚期或成熟期,生发泡偏位或消失,滤泡细胞层中颗粒细胞和膜细胞明显,达到成熟状态,表明1龄左右黄鳝卵巢可达到性成熟。肖亚梅^[2]报道黄鳝大多数在2龄性成熟,少数在3龄,产生这种差异的原因可能是实验条件的不同。研究表明,在一定温度范围内(24.5~28.5℃),黄鳝胚胎发育速度随水温升高而加快,孵出时间缩短^[10]。广州地区水温较高(本研究条件下月平均水温为14.8~27.5℃),这有可能造成黄鳝发育和性腺成熟加快。本实验连续跟踪观察了同一批次孵化的黄鳝仔鱼的卵巢发育,因此可以确定,黄鳝1龄左右可达到性成熟状态。

3.2 巴尔比尼小体

巴尔比尼小体普遍存在于动物早期卵母细胞内,是卵黄发生前细胞质中出现的一种特殊结构^[11],有时也被称作卵黄核^[12]。目前大多数学者认为,巴尔比尼小体主要是由大量不均匀的细

胞器组成,包括粗面内质网、高尔基复合体、线粒体、溶酶体和脂质体等,具有很强的嗜碱性,但关于巴尔比尼小体的功能还不清楚^[13-14]。许多硬骨鱼类初级生长期卵母细胞的核外胞质中也含有嗜碱性的巴尔比尼小体^[15-17]。本文的组织学观察结果表明:在4月龄黄鳢初级生长期卵母细胞中最先观察到呈点状的巴尔比尼小体;随着黄鳢的生长发育,卵母细胞中巴尔比尼小体浓缩成块状,数量也逐渐增多。在整个冬季,初级卵母细胞中都存在大量的巴尔比尼小体。翌年春季,随着卵母细胞进一步发育,巴尔比尼小体变小呈点状,数量降低直至消失。本研究首次描述了黄鳢初级生长期卵母细胞中巴尔比尼小体的存在、发生、发展和消亡的过程,但有关黄鳢巴尔比尼小体的组成成分、发生和变化机制,以及在卵母细胞发育中的作用还不清楚,有待进一步研究。

3.3 黄鳢 *gdf 9*、*cyp19a1a*、*amh* 和 *amhrII* 基因表达与卵巢发育

Gdf9(生长分化因子9)是卵母细胞分泌的一种生长分化因子,属 TGF- β 超家族(TGF- β superfamily),在滤泡发育中起着重要调控作用^[18-19]。研究发现,在多种硬骨鱼类发育早期的卵巢或卵母细胞中 *gdf 9* 表达水平较高,随着卵黄生成,*gdf 9* 表达量出现逐步降低的趋势^[20-25]。本研究发现:在4月龄至1龄黄鳢卵巢初次发育过程中,卵巢中 *gdf 9* mRNA 表达一直维持在较高的水平,提示黄鳢 *gdf 9* 对其卵母细胞的早期发育具有重要意义。1龄黄鳢卵巢可达到性成熟,但是卵巢中 *gdf 9* 表达水平并没有明显下降,这可能是由于黄鳢卵巢发育的个体差异以及卵巢中卵母细胞发育不同步所致。卵巢中除接近成熟的卵母细胞为主外,还含有一些初级生长期和卵黄发生早期的卵母细胞(图版-11)。这些初级生长期和卵黄发生早期的卵母细胞中的 *gdf 9* 表达水平都很高^[24]。

卵巢中性腺芳香化酶基因 *cyp19a1a* 主要在滤泡细胞中表达^[26-28],参与编码细胞色素 P450 芳香化酶,调控体内雌激素的合成^[29],与性腺分化发育密切相关^[30-31]。在黄鳢^[32]、真鲷^[30]和冲绳磨塘鳢^[31]中的研究表明:*cyp19a1a* 表达量伴随着卵母细胞中卵黄的生成而上升,而在卵母细胞成熟阶段下降。本研究发现,4月龄黄鳢卵巢中 *cyp19a1a* 表达水平低于随后的其它月龄,这可能

是由于此时黄鳢卵巢中卵母细胞外的滤泡细胞处于发育早期,功能尚未完善,*cyp19a1a* 表达水平较低。从5月龄到7月龄,黄鳢卵巢中 *cyp19a1a* 表达水平呈上升趋势,这可能与卵母细胞外滤泡细胞层不断增殖和分化相关。10月龄时,黄鳢卵巢中滤泡细胞开始分化产生颗粒细胞和膜细胞,卵母细胞中出现皮质小泡,青春期启动,卵黄开始生成。卵黄蛋白原是肝脏在雌激素的刺激下合成的^[33],10月龄时卵巢中 *cyp19a1a* 表达又出现高峰,可能与黄鳢卵巢中卵黄生成和青春期启动有关。

抗苗勒氏管激素(anti-Müllerian hormone, AMH),也称缪勒氏管抑制物(Müllerian inhibiting substance, MIS),是 TGF- β 超家族成员^[34]。在哺乳动物中,AMH 诱导雄性胚胎中苗勒氏管的退化^[35],抑制雌性生殖细胞的发育^[36]。硬骨鱼中,*amh* 在卵巢和精巢中都有表达,可能与性别分化和性腺发育过程相关^[8,37-39]。Amh 作用是通过 Amh II 型受体(Amhr II)介导,两者在鱼类性腺分化发育中呈现类似的表达模式^[8,39]。同样,本研究表明:从黄鳢4月龄到12月龄,即卵巢初次发育成熟过程中,*amh* 和 *amhrII* 基因表达水平的变化模式类似,分别在7月龄和10月龄出现表达高峰。本实验室前期研究表明,*amh* 和 *amhrII* 基因在卵巢的体细胞中特异表达^[8]。从4月龄到7月龄,黄鳢卵巢 *amh* 和 *amhrII* 表达呈现上升趋势,这可能是由于卵母细胞外滤泡细胞层的分化与增殖所致。而在10月龄时,黄鳢 *amh* 和 *amhrII* 的表达高峰与卵巢青春期启动相吻合,提示 Amh 信号可能参与黄鳢卵巢青春期启动的调节。

参考文献:

- [1] 周定刚,谭永红,付天佑. 黄鳢卵巢发育的研究[J]. 水生生物学报,1992,16(4):361-367.
- [2] 肖亚梅. 黄鳢繁殖生物学研究—II. 黄鳢的雌性发育[J]. 湖南师范大学:自然科学版,1995,18(4):45-51.
- [3] 肖亚梅,刘筠. 黄鳢由间性发育转变为雄性发育的细胞生物学研究[J]. 水产学报,1995,19(4):297-304.
- [4] Liu C K. Rudimentary hermaphroditism in the symbranchoid eel *Monopterus javanensis* [J]. Sinensia,1944,15:1-8.
- [5] Chan S T H,Phillips J G. The structure of the gonad during natural sex reversal in *Monopterus albus*

- (Pisces: Teleostei) [J]. Journal of Zoology, 1967, 151(1): 129 – 141.
- [6] Tang F. A study on the relationship between steroid hormones and natural sex reversal in the ricefield eel, *Monopterus albus* [D]. Hong Kong: University of Hong Kong, 1979.
- [7] 赵静. 黄鳝抗苗勒氏管激素 (AMH) cDNA 克隆及其表达分析 [D]. 广州: 中山大学, 2007.
- [8] 沈北岸. 黄鳝抗苗勒氏管激素 (*amh*) 及其二型受体 (*amhr II*) 基因表达研究 [D]. 广州: 中山大学, 2010.
- [9] Okuzawa K. Puberty in teleosts [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2002, 26: 31 – 41.
- [10] 杨代勤, 陈芳, 李道霞, 等. 黄鳝的胚胎发育及鱼苗培育 [J]. 湖北农学院学报, 1999, 19 (2): 149 – 153.
- [11] Guraya S S. Recent advances in the morphology, cytochemistry, and function of Balbiani's vitelline body in animal oocytes [J]. International Review of Cytology, 1979, 59: 249 – 321.
- [12] Kobayashi H, Iwamatsu T. Development and fine structure of the yolk nucleus of previtellogenic oocytes in the medaka *Oryzias latipes* [J]. Development, Growth & Differentiation, 2000, 42 (6): 623 – 631.
- [13] Iwamatsu T, Ohta T, Oshima E, *et al.* Oogenesis in the medaka *Oryzias latipes*-stage of oocyte development [J]. Zoological Science, 1988, 5: 353 – 373.
- [14] Zelazowska M, Kilarski W, Bilinski S M, *et al.* Balbiani cytoplasm in oocytes of a primitive fish, the sturgeon *Acipenser gueldenstaedtii*, and its potential homology to the Balbiani body (mitochondrial cloud) of *Xenopus laevis* oocytes [J]. Cell and Tissue Research, 2007, 329(1): 137 – 145.
- [15] Brusle S. Fine structure of early previtellogenic oocytes in *Mugil (Liza) auratus* Risso, 1810 (Teleostei, Mugilidae) [J]. Cell Tissue Research, 1980, 207(1): 123 – 134.
- [16] Selman K, Wallace R A. Review: Cellular aspects of oocyte growth in teleosts [J]. Zoological Science, 1989, 6: 211 – 231.
- [17] Cl  rot J C. Les groupements mitochondriaux des cellules germinales des poissons t  l  steens Cyprinid  s; I.   tude ultrastructurale [J]. Journal of Ultrastructure Research, 1976, 54(3): 461 – 475.
- [18] McIntosh C J, Lawrence S, Smith P, *et al.* Active immunization against the proregions of GDF9 or BMP15 alters ovulation rate and litter size in mice [J]. Reproduction, 2012, 143(2): 195 – 201.
- [19] Hussein T S, Thompson J G, Gilchrist R B. Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence [J]. Developmental Biology, 2006, 296 (2): 514 – 521.
- [20] Liu L, Ge W. Growth differentiation factor 9 and its spatiotemporal expression and regulation in the zebrafish ovary [J]. Biology of Reproduction, 2007, 76(2): 294 – 302.
- [21] Halm S, Ibanez A J, Tyler C R, *et al.* Molecular characterization of growth differentiation factor 9 (*gdf 9*) and bone morphogenetic protein 15 (*bmp15*) and their patterns of gene expression during the ovarian reproductive cycle in the European sea bass [J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2008, 291 (1 – 2): 95 – 103.
- [22] Lankford S E, Weber G M. Temporal mRNA expression of transforming growth factor-beta superfamily members and inhibitors in the developing rainbow trout ovary [J]. General and Comparative Endocrinology, 2010, 166(2): 250 – 258.
- [23] He Z, Wu Y, Xie J, *et al.* Growth differentiation factor 9 (*Gdf9*) was localized in the female as well as male germ cells in a protogynous hermaphroditic teleost fish, ricefield eel *Monopterus albus* [J]. General and Comparative Endocrinology, 2012, 178 (2): 355 – 362.
- [24] Lokman P M, Kazeto Y, Ozaki Y, *et al.* Effects of reproductive stage, GH, and 11-ketotestosterone on expression of growth differentiation factor-9 in the ovary of the eel, *Anguilla australis* [J]. Reproduction, 2010, 139(1): 71 – 83.
- [25] Liu Z, Chen A, Yang Z, *et al.* Molecular characterization of growth differentiation factor 9 and its spatio-temporal expression pattern in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) [J]. Molecular Biology Reports, 2012, 39(4): 3863 – 3870.
- [26] Sunobe T, Nakamura M, Kobayashi Y, *et al.* Aromatase immunoreactivity and the role of enzymes in steroid pathways for inducing sex change in the hermaphrodite gobiid fish *Trimma okinawae* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2005, 141 (1): 54 – 59.
- [27] Kobayashi Y, Horiguchi R, Miura S, *et al.* Sex- and tissue-specific expression of P450 aromatase (*cyp19a1a*) in the yellowtail clownfish, *Amphiprion*

- clarkii [J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2010, 155(2): 237 – 244.
- [28] Huang W, Zhou L, Li Z, *et al.* Expression pattern, cellular localization and promoter activity analysis of ovarian aromatase (Cyp19a1a) in protogynous hermaphrodite red-spotted grouper [J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2009, 307 (1): 224 – 236.
- [29] Guiguen Y, Baroiller J F, Ricordel M J, *et al.* Involvement of estrogens in the process of sex differentiation in two fish species; the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and a tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Molecular Reproduction and Development, 1999, 54(2): 154 – 162.
- [30] Gen K, Okuzawa K, Kumakura N, *et al.* Correlation between messenger RNA expression of cytochrome P450 aromatase and its enzyme activity during oocyte development in the red seabream (*Pagrus major*) [J]. Biology of Reproduction, 2001, 65 (4): 1186 – 1194.
- [31] Kobayashi Y, Kobayashi T, Nakamura M, *et al.* Characterization of two types of cytochrome P450 aromatase in the serial-sex changing gobiid fish, *Trimma okinawae* [J]. Zoological Science, 2004, 21 (4): 417 – 425.
- [32] Zhang Y, Zhang W, Yang H, *et al.* Two cytochrome P450 aromatase genes in the hermaphrodite ricefield eel *Monopterus albus*; mRNA expression during ovarian development and sex change [J]. Journal of Endocrinology, 2008, 199(2): 317 – 331.
- [33] Senthilkumaran B, Yoshikuni M, Nagahama Y. A shift in steroidogenesis occurring in ovarian follicles prior to oocyte maturation [J]. Molecular and cellular Endocrinology, 2004, 215(1): 11 – 18.
- [34] Cate R L, Mattaliano R J, Hession C, *et al.* Isolation of the bovine and human genes for Müllerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells [J]. Cell, 1986, 45 (5): 685 – 698.
- [35] Lee M M, Donahoe P K. Müllerian inhibiting substance: a gonadal hormone with multiple functions [J]. Endocrine Reviews, 1993, 14(2): 152 – 164.
- [36] Durlinger A L L, Kramer P, Karels B, *et al.* Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary [J]. Endocrinology, 1999, 140(12): 5789 – 5796.
- [37] Miura T, Miura C, Konda Y, *et al.* Spermatogenesis-preventing substance in Japanese eel [J]. Development, 2002, 129(11): 2689 – 2697.
- [38] Rodríguez-Marín A, Yan Y L, BreMiller R A, *et al.* Characterization and expression pattern of zebrafish Anti-Müllerian hormone (Amh) relative to sox9a, sox9b, and cyp19a1a, during gonad development [J]. Gene Expression Patterns, 2005, 5(5): 655 – 667.
- [39] Wu G C, Chiu P C, Lyu Y S, *et al.* The expression of amh and amhr2 is associated with the development of gonadal tissue and sex change in the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegelii* [J]. Biology of Reproduction, 2010, 83(3): 443 – 453.

The initial ovarian development and the expression of some related genes in ricefield eel, *Monopterus albus*

HE Zhi^{1,2}, LI Yixue¹, ZHANG Biyu¹, ZHANG Weimin,¹ ZHANG Lihong^{1*}

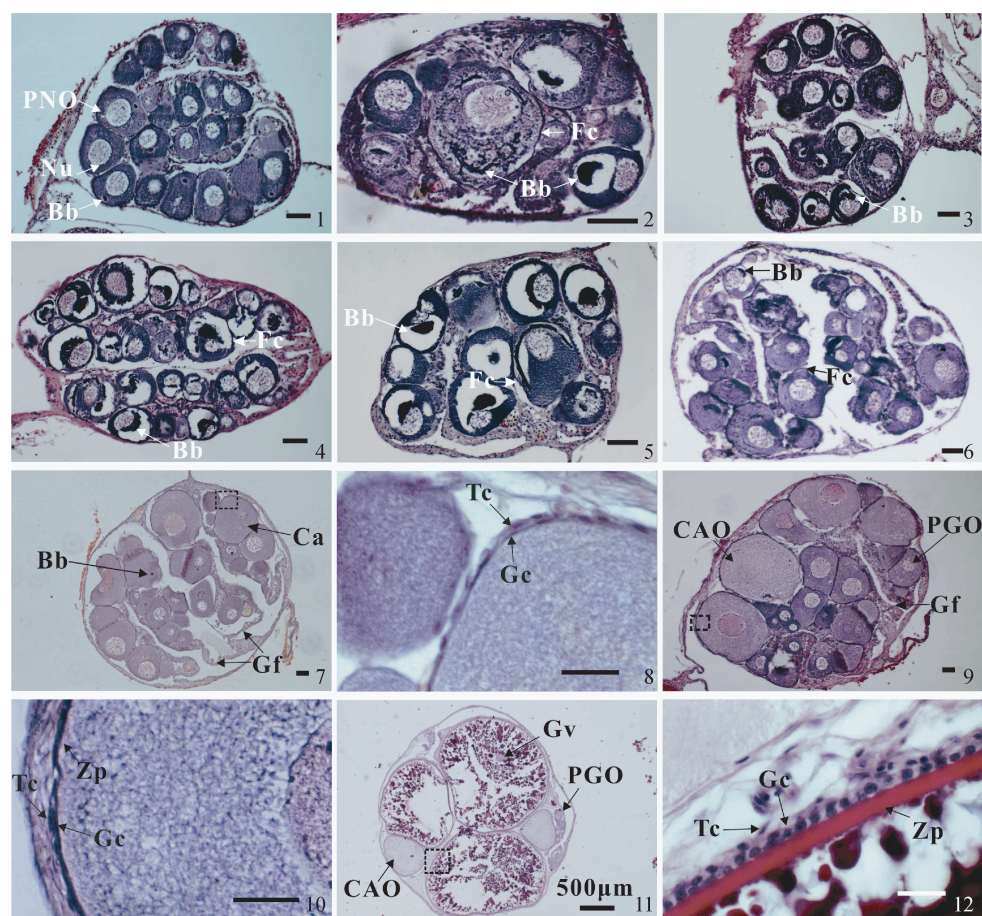
(1. School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

2. College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: The initial ovarian development of ricefield eel *Monopterus albus* raised under laboratory conditions was investigated with histological analysis, and the expression of *gdf 9* (growth differentiation factor 9), *cyp19a1a* (P-450 aromatase), *amh* (anti-Müllerian hormone) and *amhrII* (anti-Müllerian hormone type II receptor) was analyzed with Real-time PCR assay. From the age of 4 months to 9 months, the oocytes in the ovary of juvenile ricefield eel remained in the primary growth stage, and the basophilic Balbiani's vitelline bodies (Bb) increased in number at the beginning, then decreased, and Bb's shape changed from dot at first to large cluster, then to small cluster. At the age of 10 months, the oocytes in the ovary of the juvenile ricefield eel entered the secondary growth stage, with the appearance of cortical alveoli in the cytoplasm and the differentiation of the somatic cells around the oocyte into granulosa and theca cells, and Bb either disappeared or degenerated to dot, indicating that the ovarian puberty of the juvenile ricefield eel was initiated. At the age of 12 months, the ovary of the ricefield eel was filled with late-vitellogenic oocytes containing migratory or disintegrated germinal vesicles, and reached maturity. The expression of *gdf 9* was high and did not vary significantly from the age of 4 to 12 months, suggesting its indispensable roles in ovarian development during this period. The expression levels of *amh*, *amhrII*, and *cyp19a1a* increased in ricefield eels at the age of 4 to 7 months, but decreased at 8 months. However, the expression of these genes increased at the age of 10 months, coinciding with the initiation of puberty. Taken together, the results of present study indicated that juvenile ricefield eels initiated ovarian pubertal development at the age of ten months, and might reach ovarian maturation at the age of one year. The expression of *amh*, *amhrII*, and *cyp19a1a* might play important roles in the initiation of ovarian puberty.

Key words: *Monopterus albus*; ovary development; puberty; functional genes

Corresponding author: ZHANG Lihong. E-mail: zhlih@mail.sysu.edu.cn



图版 黄鳝幼鱼卵巢首次发育成熟组织学变化

1. 4 月龄(当年 10 月); 2. 5 月龄(当年 11 月); 3. 6 月龄(当年 12 月); 4. 7 月龄(次年 1 月); 5. 8 月龄(次年 2 月); 6. 9 月龄(次年 3 月); 7. 10 月龄(次年 4 月); 8. 图版-7 方框区域放大图; 9. 11 月龄(次年 5 月); 10. 图版-9 中方框区域放大图; 11. 12 月龄(次年 6 月); 12. 图版-11 方框区域放大图。

Bb. 巴尔比尼小体; Fc. 滤泡细胞; Nu. 核仁; PNO. 核仁外周期阶段卵母细胞; CAO. 皮质小泡期卵母细胞; PGO. 初级生长期卵母细胞; Gc. 颗粒细胞; Tc. 膜细胞; Zp. 透明带; Ca. 皮质小泡; Gv. 生发泡。除特别标注外, 标尺为 20 μm 。

Plate The histology of initial ovarian development in ricefield eel

1. age of four months(October); 2. age of five months(November); 3. age of six months(December); 4. age of seven months(January of next year); 5. age of eight months(February of next year); 6. age of nine months(March of next year); 7. age of ten months(April of next year); 8. higher magnification of the boxed area in Plate-7; 9. age of months(May of next year); 10. higher magnification of the boxed area in Plate-9; 11. age of twelve months(June of next year); 12. the higher magnification of the boxed area in Plate-11.

Bb. Balbiani's body; Fc. follicle cell; Nu. nucleus; PNO. perinucleolus phase oocytes; CAO. cortical alveolus stage oocytes; PGO. primary growth stage oocytes; Gc. granulosa cell; Tc. theca cell; Zp. zona pellucida; Ca. cortical alveolus; Gv. germinal vesicle. Scale bar = 20 μm except where specifically designated.