

团头鲂性腺发育不同时期组织学观察及 *Kiss2/Kiss2r* 基因表达分析

温久福¹, 高泽霞¹, 罗伟¹, 童金苟², 王卫民¹

(1. 华中农业大学水产学院, 农业动物遗传育种与繁育教育部重点实验室, 农业部淡水生物繁育重点实验室, 湖北 武汉 430070; 2. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 湖北 武汉 430072)

摘要: *Kiss* 基因 (*Kisspeptin*) 及其受体 *Kissr* 基因 (*Kiss receptor*) 组成的系统参与下丘脑-垂体-性腺轴功能的调节, 在脊椎动物青春启动的过程中发挥重要作用。该研究通过组织切片技术观察了团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 卵巢和精巢的不同分期, 进一步采用荧光定量 PCR 技术分析比较了团头鲂 *Kiss2* 和 *Kiss2r* 基因在雌、雄性腺不同时期对应的脑、垂体、性腺组织中的表达量。组织切片观察明确鉴别出团头鲂卵巢和精巢发育 I 期至 VI 期的性腺组织结构, 基因荧光定量 PCR 分析结果表明 *Kiss2/Kiss2r* 系统主要是通过增加团头鲂卵巢发育 II 期时脑和垂体的表达量以及 III 期精巢的表达量来发挥生殖启动作用。

关键词: 团头鲂; *Kiss2/Kiss2r* 系统; 性腺发育; 基因表达

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

文章编号: 2095-0780-(2013)03-0044-07

Observation of gonad at different development stages and expression analysis of *Kiss2/Kiss2r* genes in *Megalobrama amblycephala*

WEN Jiufu¹, GAO Zexia¹, LUO Wei¹, TONG Jingou², WANG Weimin¹

(1. Key Lab. of Agricultural Animal Genetics, Breeding and Reproduction of Ministry of Education; Key Lab. of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture; College of Fishery, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 2. State Key Lab. of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

Abstract: Lots of studies have proved that *Kiss* gene and its receptor gene *Kissr* play an important role in the regulation of the gonadotropic axis, especially in the timing of puberty in vertebrates. We identified the gonad development of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) from stage I to stage VI using tissue slice technology, detected the *Kiss2* and *Kiss2r* gene transcription in the brain through quantitative real time PCR (qPCR), and collected pituitary and gonad tissues of the samples during different stages. The qPCR results show that *Kiss2/Kiss2r* play roles in the onset of puberty in *M. amblycephala* by increasing the expression of pituitary and gonad during ovary development in stage II, and the expression of testis in stage III.

Key words: *Megalobrama amblycephala*; *Kiss2/Kiss2r* system; gonad development; gene expression

脊椎动物的性成熟表现为一个复杂的调控过程, 通过下丘脑-脑垂体-性腺 (hypothalamic-pituitary-gonad, HPG) 这个生殖内分泌调控轴来调控其性腺发育、成熟、排精和产卵。下丘脑通过分泌促性

腺激素释放激素 (gonadotropin-releasing hormone, GnRH) 刺激卵泡生成激素 (follicle-stimulating hormone, FSH) 和黄体生成激素 (luteinizing hormone, LH) 的释放来实现生殖调控中的功能。近年来, 越

收稿日期: 2013-01-24; 修回日期: 2013-03-06

资助项目: 国家自然科学基金项目 (31201988); 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-46-05); 教育部新教师基金项目 (20110146120021); 淡水生态与生物技术国家重点实验室开放课题 (2012FB06)

作者简介: 温久福 (1988-), 男, 硕士研究生, 从事鱼类遗传育种研究。E-mail: zhangxhui1987@163.com

通信作者: 王卫民 (1959-), 男, 教授, 从事鱼类遗传育种研究。E-mail: wangwm@mail.hzau.edu.cn

越来越多的研究显示 *Kiss* (*Kisspeptin*) 及其受体 *Kissr* (*Kiss receptor*) 组成的系统通过参与调控 GnRH 的分泌在哺乳动物和鱼类的生殖启动、繁殖的代谢调控中发挥着重要作用^[1-4]。青春期开始前下丘脑中 *Kiss* 及其受体基因表达升高, 引起受体信号转导增强, 从而可以激活 GnRH 依赖性的 LH 和 FSH 的释放, 进而诱导促性腺轴的性早熟激活。*Kiss/Kissr* 基因具有多种同源基因和不同亚型^[5], 它们在生殖调控中的作用具有物种特异性。如塞内加尔鲷 (*Solea senegalensis*) 具有 2 种不同剪切体 *Ss Kiss1r v1* 和 *Ss Kiss1r v2*, 它们的表达具有组织特异性。在脑部 *Ss Kiss1r v1* 的表达量远高于 *Ss Kiss1r v2*, 但是从青春期发育到成熟的过程其表达量都逐渐下降, 这与鲮鱼 (*Pimephales promelas*) 和斑马鱼 (*Danio rerio*) *Kiss1ra* 的表达趋势一致^[6-8]; 在罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 和军曹鱼 (*Rachycentron canadum*) 的青春期发育中 *Kiss2r* 的表达量却不断增加^[9-10]。在塞内加尔鲷性成熟过程中性腺组织的 *Ss Kiss1r v1* 和 *Ss Kiss1r v2* 表达量并没有显著性差异, 而鲮鱼 (*Mugil cephalus*) 卵巢 *Kiss2r* 的表达量在青春期发育过程逐渐增加^[11]。成熟雄性罗非鱼 *Kiss2r* 表达量远高于非成熟个体^[9]; 条纹鲈^[12] (*Morone*) 的 *Kiss1/Kiss1r*, *Kiss2/Kiss2r* 在青春期前都没有增加表达量, 但是在雌性成熟个体中都显著增加, 其中 *Kiss2* 在成熟雄性中的表达量也升高; 在青春期发育早期, 鲮鱼、军曹鱼、庸鲈 (*Hippoglossus hippoglossus*)、鲮鱼脑部的 *Kiss2r* 表达量均有增加^[6,10-11,13]。在雌性斑马鱼脑中 *Kiss1rb* 的表达量随着青春期的到来达到高峰; 无论雌性还是雄性个体 *Kiss1ra* 在春期发生之前开始升高并一直保持较高状态^[7]。日本鲷 (*Scomber japonicus*) 雄性个体 *Kiss1*, *Kiss2* 的表达量从未性成熟到精子排出一直处于下降状态, 在繁殖后达到最低水平; *Kiss1* 在雌性个体脑组织的表达量没有波动, 而 *Kiss2* 的表达从非成熟时期到繁殖后一直下降; 垂体 *Kiss1* 的表达量也变化不大, 同时与未成熟和产卵后相比性腺中 *Kiss1* 的表达量在精子排出和卵黄形成后期明显升高^[14]。在一些鱼类中也检测了 *Kiss/Kissr* 基因在不同季节的表达变化。暗纹东方鲀 (*Takifugu niphobles*) *Kiss2* 和 *Kiss2r* 在垂体的表达量繁殖季节高于非繁殖季节^[15]; *Kiss2* 在红海鲤 (*Pagrus major*) 的研究结果与暗纹东方鲀类似^[16]。目前已对多种鱼类 *Kiss2/Kiss2r* 系统在青春期启动作用进行了研

究, 但国内的相关研究报道还很少。

团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 属于鲤形目, 鲤科, 鲂属, 又名武昌鱼, 是中国特有的重要草食性经济鱼类之一^[17]。然而因其自然分布较窄, 遗传多样性基础弱小, 在多年人工养殖过程中养殖群体出现了性成熟提早的不良趋势^[18]。鱼类的性早熟间接影响其生长速度和肉质, 对团头鲂的选育工作造成不利影响。该研究通过分析 *Kiss2/Kiss2r* 基因在团头鲂性腺发育不同阶段的表达情况, 明确其在团头鲂生殖调控中的作用, 为揭示团头鲂性早熟分子机制提供参考, 同时为筛选团头鲂生殖内分泌调控相关功能基因提供基础信息。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验鱼取自鄂州团头鲂 (武昌鱼) 原种场。采集 2 月龄、6 月龄、12 月龄以及性成熟的团头鲂的性腺, 采集样品的一侧性腺固定保存在 Bouin's 液, 用于组织切片; 另一侧性腺及个体的脑和垂体先放在液氮中保存, 然后转到 -80 °C 冰箱, 用于总 RNA 提取。其中 I 期性腺采自 2 月龄团头鲂, II 期性腺采自 6 月龄团头鲂, III、IV 期性腺采自 12 月龄团头鲂, 在繁殖时期以及繁殖后从性成熟团头鲂采集 V、VI 期性腺。该试验对性腺发育 I 到 VI 期的组织样品进行基因荧光定量表达分析, 而成熟系数只分析性腺分期为 II 到 IV 期的 12 月龄团头鲂样品。

1.2 试验方法

1.2.1 性腺组织切片 固定好的样品用梯度酒精脱水, 甲苯透明, 石蜡包埋。切片厚度 5 ~ 6 μm, H·E 染色, 中性树胶封片, Olympus 显微镜观察并摄影。通过组织学观察判断性腺分期, 并拍照记录, 参照施琰芳等^[19]的方法进行性腺分期。从腹腔两侧分离出性腺并称质量, 按此公式计算成熟系数 (gonadosomatic index, GSI) 成熟系数 = (性腺质量/体质量) × 100%。

1.2.2 Real time PCR 定量分析 采集同一性腺分化时期的脑、垂体和性腺组织, 每 3 条鱼同一组织混合在一起, 雌雄分开, 用于提取 RNA。提取后的 RNA 溶于 DEPC 处理水后, 首先采用 1% 琼脂糖电泳检测 RNA 的完整性, 然后使用 NanoDrop 2000 来检测其浓度, 选取质量较好的 RNA, 按照 TaKaRa 公司 TPrimeScript® RT reagent Kit with gD-

NA Eraser 试剂盒提供的方法合成 cDNA, 随后以 cDNA 为模板使用表达引物进行 PCR 扩增, 经琼脂糖检测合格后储存于 -20 ℃ 备用。

使用 Real time PCR 方法检测性腺发育不同阶段 *Kiss2* 和 *Kiss2r* 的表达, real-time PCR 在 Rotor-Gene® Q 实时荧光定量 PCR 分析仪 (QIAGEN) 上进行。PCR 反应体系 20 μL, 包括 5 倍梯度稀释的 cDNA 模板 2 μL, 10 μmol·L⁻¹ 基因特异性的正反向引物各 0.5 μmol·L⁻¹, 10 μL SYBR® Premix Ex

TagTM II, ddH₂O 7 μL。反应条件为 95 ℃, 1 min; 95 ℃, 5 s; 49.5 ℃ (*Kiss2*)/50.4 ℃ (*Kiss2r*) 20 s; 72 ℃, 25 s, 并随之采集荧光信号, 40 个循环; 随后进行融解曲线的扩增, 试验设 3 次重复。相对定量的解析使用标准曲线的定量方法, 内参基因选择 *β-actin*, 基因表达所用引物应用 Primer 5.0 设计 (表 1)。试验数据分析采用 SPSS 19.0 软件的单样本 *t* 检验, 当 *P* < 0.05 时为差异显著, 相关图表通过 Excel 2003 和 SigmaPlot 12.0 进行制作。

表 1 基因荧光定量 PCR 所用引物序列
Tab. 1 Sequences of primers used for genes qPCR

基因 genes	引物序列 primer sequence (5'→3')	
<i>Kiss2</i> (GenBank: KC136218)	F: CGTCAGAGTCCGTAGTTGTC	R: ACTCCAAGCAGCACTATCTC
<i>Kiss2r</i> (GenBank: KC146704)	F: GGCCACTAAGTCTACATTGC	R: ATGGCCATTGTCTTGAAG
<i>β-actin</i> (GenBank: AY170122.2)	F: CGGACAGGTCATCACCATTG	R: CGCAAGACTCCATACCCAAGA

2 结果

2.1 精巢发育组织结构

I 期精巢外观呈细线状, 精小叶未形成, 精巢中分布有大量精原细胞, 精原细胞圆形, 细胞质为弱嗜碱性 (图 1-a)。II 期精巢, 细带状, 不透明, 血管不发达, 精小叶形成, 细胞时相仍是精原细胞 (图 1-b)。III 期精巢外观呈棒状, 血管发达, 精小叶出现腔, 生殖细胞包含精原细胞、初级精母细胞、次级精母细胞以及少量精子细胞。初级精母细胞沿精小叶边缘单层或多层排列 (图 1-c)。IV 期精巢乳白色, 表面有血管分布。此期晚期能挤出白色精液。切片观察可以看到精小叶腔内充满大量染色很深的精子 (图 1-d)。V 期精巢发育很成熟, 乳白色, 精小叶腔扩大, 提起头部或轻压腹部时有大量精液流出。显微镜下看到大量成片染成紫色的精子 (图 1-e)。VI 期精巢由于精子排出, 所以呈松弛的细带状。切片显示, 精巢壁增厚, 精小叶边缘的精小囊萎缩, 精小叶腔中只有少量精子 (图 1-f)。

2.2 卵巢发育组织结构

I 期卵巢的整体外部形态是细线状, 胞体最小, 胞质最少, 核大而明显, 具有活跃的分裂能力 (图 2-a)。II 期卵巢透明, 扁平带状, 肉眼看不到卵粒。这一时期的初级卵母细胞呈多角形, 核仁

数增加, 靠近核膜内侧分布。在细胞质中出现卵黄核 (图 2-b)。III 期卵巢明显变大呈棒状, 肉眼可见细小的卵粒。显微镜下观察卵巢中以 III 时相的卵母细胞为主, 出现液泡, 卵母细胞开始沉积卵黄且直径不断扩大, 卵质中尚未完全充塞卵黄, 卵膜变厚, 外周出现辐射带 (图 2-c)。IV 期卵巢明显膨胀, 呈囊状, 肉眼可见增大的卵粒; 卵黄颗粒几乎充满核外空间。细胞核开始由中央直接移向动物极 (图 2-d)。V 期卵巢完全成熟, 卵巢松软, 卵已排于卵巢腔中, 轻压腹部即有成熟卵流出。这一时相的细胞由初级卵母细胞向次级卵母细胞过渡阶段。细胞质中充满粗大的卵黄颗粒 (图 2-e)。VI 期卵巢囊状, 组织松软, 体积缩小。卵巢中含有大量空滤泡以及 II 和 III 时相的卵母细胞 (图 2-f)。

2.3 *Kiss2/Kiss2r* 在性腺不同发育时期的表达

提取的组织样品 RNA 经过 1% 的琼脂糖电泳检测, 完整性良好, 无明显降解现象, 能够用于下一步试验 (图 3)。 *Kiss2* 在雄鱼性腺不同发育时期对应的脑和垂体组织中的表达变化趋势基本一致, 在 II 期和 V 期出现峰值, 精巢中的表达量趋势也类似, 但在 III 期表达量出现最大值; 而在雌鱼卵巢/垂体和脑组织中表达模式一致, 都是在性腺发育 II 期时表达量最高; 并且 *Kiss2* 在雌、雄个体脑和垂体组织中的表达模式类似 (图 4)。 *Kiss2r* 在雄鱼性腺发育 I 期的脑和垂体的表达量较高, 此后一直下

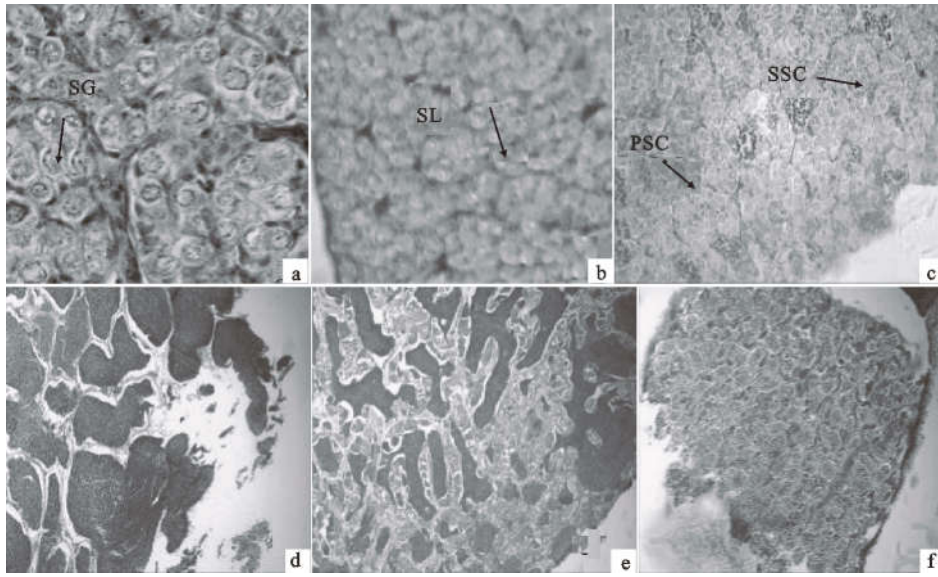


图1 团头鲂精巢发育各时期的切片组织结构

a. I期精巢(×400); b. II期精巢(×400); c. III期精巢(×400); d. IV期精巢(×100); e. V期精巢(×100); f. VI期精巢(×100); SG. 精原细胞, SL. 精小叶, PSC. 初级精母细胞, SSC. 次级精母细胞

Fig. 1 Microstructure of *M. amblycephala* in different testis development stages

a. testis at stage I (×400); b. testis at stage II (×400); c. testis at stage III (×400); d. testis at stage IV (×100); e. testis at stage V (×100); f. testis at stage VI (×100); SG. spermatogonium; SL. seminal lobule; PSC. primary spermatocytes; SSC. secondary spermatocytes

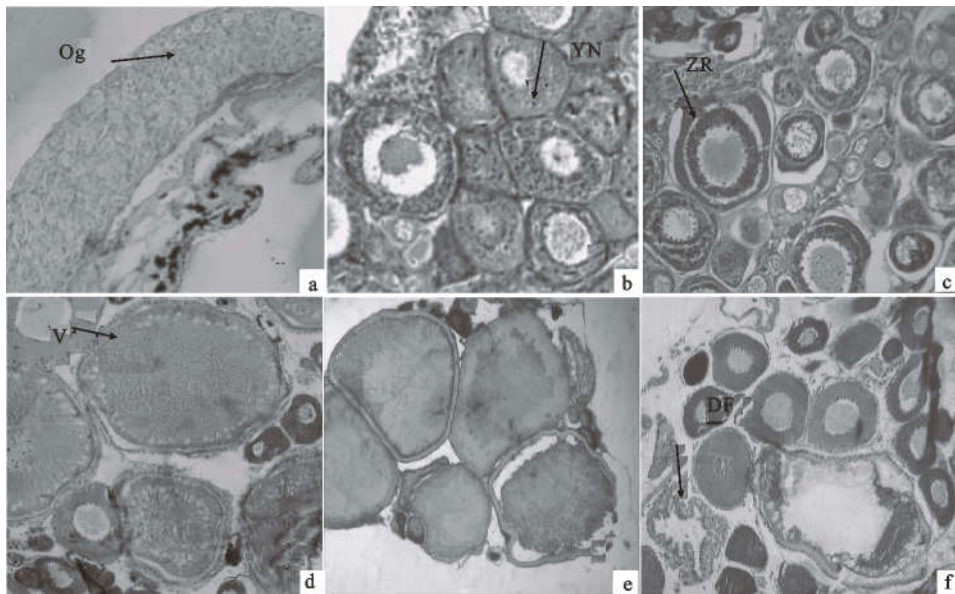


图2 团头鲂卵巢发育各时期的切片组织结构

a. I期卵巢(×100); b. II期卵巢(×400); c. III期卵巢(×400); d. IV期卵巢(×100); e. V期卵巢(×100); f. VI期卵巢(×100); Og. 卵原细胞; YN. 卵黄核; ZR. 辐射带; V. 液泡; DF. 空滤泡

Fig. 2 Microstructure of *M. amblycephala* in different testis development stages

a. ovary at stage I (×100); b. ovary at stage II (×400); c. ovary at stage III (×400); d. ovary at stage IV (×100); e. ovary at stage V (×100); f. ovary at stage VI (×100); Og. oogonium; YN. yolk nucleus; ZR. zona radiata; V. vesicles; DF. discharged follicles

降,但是在精巢组织中的表达却处于不断的波动状态,并在Ⅲ期表达量出现最大值;在雌鱼脑和垂体的表达变化较为明显,脑和垂体在Ⅱ期和Ⅵ期表达

较高;而在卵巢中一直比较平稳(图5)。总体来说, *Kiss2/Kiss2r* 在雄鱼不同组织中的表达模式不同,但是在性腺发育到Ⅲ期时都具有较高的表达

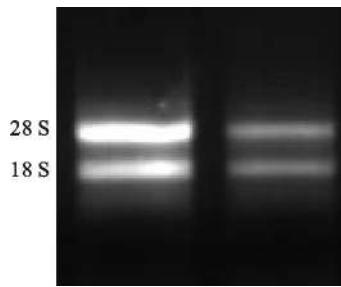


图3 组织 RNA 完整性检测结果

Fig. 3 Result of RNA integrity test

量；而在雌鱼脑和垂体的表达模式类似，只是 *Kiss2r* 在卵巢中的表达较为平稳，在所检测的表达时期其表达变化具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

3 讨论

团头鲂正常性成熟年龄为 2~3 龄，该研究通过对采集的团头鲂样品进行性腺组织切片观察，结果显示 12 月龄的团头鲂存在性早熟现象，其性腺已经发育到 IV 期，部分个体的成熟系数达到 5.58%

甚至 9.52%。统计分析显示 12 月龄团头鲂个体生长速度与性腺发育程度是显著相关的 ($P < 0.05$)，说明性成熟前团头鲂 12 月龄个体的性腺发育进程与营养生长是正相关的 (表 2)，生长控制因素和生殖调控因素是互相促进，共同实现生长和生殖的发育；也说明性早熟个体的生长速度减慢是发生在其性早熟之后。

笔者研究应用 qPCR 检测了团头鲂性发育、成熟过程中 *Kiss2/Kiss2r* 基因 cDNA 在性腺、脑、垂体组织中的表达变化情况。结果显示 *Kiss2* 在雄性个体 III 精巢组织中的表达量出现较高峰值，说明 *Kiss2* 在团头鲂雄性生殖启动中发挥重要作用^[20]。但是，*Kiss2* 基因在雌性个体性腺、脑和垂体中的表达量在卵巢发育 II 期出现高表达，而后逐渐下降，提示 *Kiss2* 在雌性生殖轴中的功能主要是在生殖启动早期，在斑马鱼、鲮鱼中的研究结果也发现类似的表达模式^[7-8]；在性腺 VI 期表达量明显升高，进一步说明其对 II 时相生殖细胞的发育具有调控作用。*Kiss2r* 在雄性个体的生殖发育过程其脑和

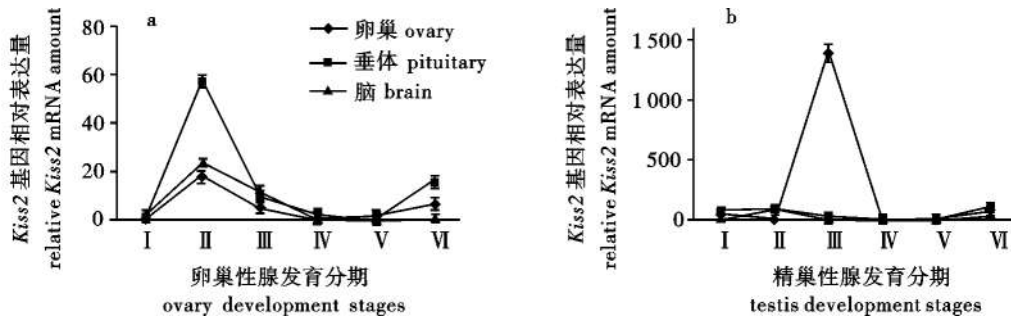
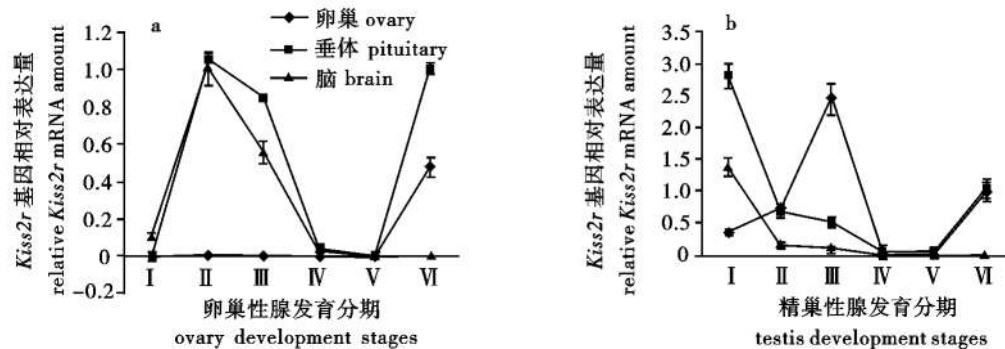
图4 *Kiss2* 基因在团头鲂雌性(a)和雄性(b)个体性腺发育不同时期的表达分析Fig. 4 qPCR expression level of *Kiss2* during different gonad development stages in females (a) and males (b) *M. amblycephala*图5 *Kiss2r* 基因在团头鲂雌性(a)和雄性(b)个体性腺发育不同时期的表达分析Fig. 5 qPCR expression level of *Kiss2r* during different gonad development stages in females (a) and males (b) *M. amblycephala*

表 2 12 月龄团头鲂样品信息表

Tab. 2 Characteristics of collected one year old *M. amblycephala*

编号 No.	体质量/g body weight	体长/cm body length	性腺质量/g gonad weight	性腺分期 gonad stage	成熟系数/% GSI
1	35.69	13.40	0.12	Ⅱ	0.30
2	31.28	12.70	0.18	Ⅱ	0.58
3	102.37	16.83	0.57	Ⅱ	0.56
4	39.14	13.51	0.50	Ⅱ	1.28
5	90.42	16.21	0.70	Ⅱ	0.77
6	146.69	18.70	0.64	Ⅱ	0.44
7	39.47	13.21	0.66	Ⅲ	1.67
8	113.30	18.12	1.18	Ⅲ	1.04
9	170.32	20.19	0.38	Ⅲ	0.22
10	78.96	15.32	1.68	Ⅲ	2.13
11	156.70	19.54	3.85	Ⅲ	2.46
12	134.60	18.52	2.58	Ⅲ	1.92
13	108.59	17.43	2.41	Ⅲ	2.22
14	79.56	15.60	1.98	Ⅲ	2.49
15	115.69	17.40	1.89	Ⅲ	1.63
16	111.42	16.80	1.96	Ⅲ	1.76
17	62.38	14.80	0.64	Ⅲ	1.03
18	120.12	17.80	0.60	Ⅲ	0.50
19	122.89	18.50	0.92	Ⅲ	0.75
20	75.05	15.21	1.54	Ⅲ	2.05
21	73.27	15.09	1.46	Ⅲ	1.99
22	75.15	15.22	1.67	Ⅲ	2.22
23	63.32	14.51	0.96	Ⅲ	1.52
24	64.67	14.45	0.73	Ⅲ	1.13
25	82.60	16.40	4.61	Ⅳ	5.58
26	128.49	18.20	5.04	Ⅳ	3.92
27	129.28	18.70	4.50	Ⅳ	3.48
28	137.86	19.30	4.84	Ⅳ	3.51
29	132.80	19.60	12.64	Ⅳ	9.52
30	136.04	18.90	4.98	Ⅳ	3.66

垂体的表达量一直在降低，而在雌性个体的 I 期性腺表达量处于较低值，说明 *Kiss2r* 基因在脑部的表达具有雌雄差异^[21] ($P < 0.05$)；但是在 III 期精巢的表达量出现最大值，也提示精巢是 *Kiss2r* 对雄性团头鲂体现其生殖启动功能的主要靶组织；在雌性团头鲂的性成熟过程中，*Kiss2r* 在脑和垂体的表达量出现波动，在 II 期和 VI 期较高，表明脑和垂体是其主要功能区域，其对生殖启动的调控作用主要是在生殖细胞发育到 II 时相时进行；但是 *Kiss2r* 在卵巢组织中 I 到 V 期都没有表达，可能对团头鲂第一次性成熟前的生殖启动不发挥作用，在小鼠 (*Mus*

musculus) 的性腺发育过程中也有同样的发现^[22]。*Kiss2/Kiss2r* 在 III 期精巢组织和卵巢发育到 II 期时的团头鲂脑和垂体组织中的高表达说明 *Kiss2* 和 *Kiss2r* 是协同作用，共同实现生殖启动功能。*Kiss2/Kiss2r* 在团头鲂雌雄生殖细胞从不成熟到生殖成熟的生殖启动过程发挥作用，能够刺激卵黄形成和精子发生；有学者认为雄鱼进入生殖启动时期是以精子的发生为标志，而雌鱼是以卵黄形成为标志^[23]，笔者研究显示 *Kiss2/Kiss2r* 系统对团头鲂生殖启动调控的作用机制与这一观点是完全相符的。从生殖启动开始，机体的主要能量也逐渐转移到生

殖发育上去,因此 *Kiss2/Kiss2r* 可能涉及团头鲂性早熟相关调控机制,但其具体的作用机制还需要进一步的研究。

笔者研究结合团头鲂性腺发育组织切片观察及 *Kiss2/Kiss2r* 基因 cDNA 在其性腺发育不同时期的表达量分析,认为 *Kiss2/Kiss2r* 系统对团头鲂生殖调控的作用机制主要是在卵巢发育到Ⅱ期和精巢Ⅲ期时发挥作用,并且该基因系统可能涉及性早熟的调控机制。该研究结果为今后筛选团头鲂生殖内分泌调控相关功能基因以及相关选育研究提供了基础数据。

参考文献:

- [1] LEE D K, NGUYEN T, O'NEILL G P, et al. Discovery of a receptor related to the galanin receptors[J]. FEBS Lett, 1999, 446(1): 103–107.
- [2] MESSENGER S, CHATZIDAKI E E, MA D, et al. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(5): 1761–1766.
- [3] KOTANI M, DETHEUX M, VANDENBOGAERDE A, et al. The metastasis suppressor gene *Kiss-1* encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor *GPR54*[J]. J Biol Chem, 2001, 276(37): 34631–34636.
- [4] ROA J, AGUILAR E, DIEGUEZ C, et al. New frontiers in kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function[J]. Front Neuroendocrinol, 2008, 29(1): 48–69.
- [5] PASQUIER J, LAFONT A G, TOSTIVINT H, et al. Comparative evolutionary histories of kisspeptins and kisspeptin receptors in vertebrates reveal both parallel and divergent features[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2012, 3(1): 173.
- [6] MECHALY A S, VIÑAS J, PIFERRER F, et al. Identification of two isoforms of the kisspeptin-1 receptor (*Kiss1r*) generated by alternative splicing in a modern teleost, the Senegalese sole (*Solea senegalensis*) [J]. Biol Reprod, 2009, 80(1): 60–69.
- [7] FILBY A L, VAN AERLE R, DUITMAN J, et al. The kisspeptin/gonadotropin releasing hormone pathway and molecular signaling of puberty in fish[J]. Biol Reprod, 2008, 78(2): 278–289.
- [8] BIRAN J, BEN-DOR S, LEVAVI-SIVAN B. Molecular identification and functional characterization of the kisspeptin/kisspeptin receptor system in lower vertebrates [J]. Biol Reprod, 2008, 79(4): 776–786.
- [9] PARHAR I S, OGAWA S, SAKUMA Y. Laser-captured single digoxigenin-labeled neurons of gonadotropin-releasing hormone types reveal a novel G protein-coupled receptor (*gpr54*) during maturation in cichlid fish [J]. Endocrinology, 2004, 145(8): 3613–3618.
- [10] MOHAMED J S, BENNINGHOFF A D, HOLT G J, et al. Developmental expression of the G protein-coupled receptor 54 and three *GnRH* mRNAs in the teleost fish cobia[J]. J Mol Endocrinol, 2007, 38(1/2): 235–244.
- [11] NOCILLADO J N, LEVAVI-SIVAN B, CARRICK F, et al. Temporal expression of G-protein-coupled receptor 54 (*GPR54*) gonadotropin-releasing hormones (*GnRH*), and dopamine receptor D2 (*drd2*) in pubertal female grey mullet, *Mugil cephalus* [J]. Gen Comp Endocrinol, 2007, 150(2): 278–287.
- [12] ZMORA N, STUBBLEFIELD J, ZULPERI Z, et al. Differential and gonad stage-dependent roles of kisspeptin1 and kisspeptin2 in reproduction in the modern teleosts, *Morone* species [J]. Biol Reprod, 2012, 86(6): 177. doi: 10.1095/biolreprod.111.097667.
- [13] MECHALY A S, VIÑAS J, MURPHY C, et al. Gene structure of the *Kiss1* receptor-2 (*Kiss1r-2*) in the Atlantic halibut; insights into the evolution and regulation of *Kiss1r* genes[J]. Mol Cell Endocrinol, 2010, 317(1/2): 78–89.
- [14] SELVARAJ S, KITANO H, FUJINAGA Y, et al. Molecular characterization, tissue distribution, and mRNA expression profiles of two *Kiss* genes in the adult male and female chub mackerel (*Scomber japonicus*) during different gonadal stages [J]. Gen Comp Endocrinol, 2010, 169(1): 28–38.
- [15] SHAHJAHAN M, MOTOHASHI E, DOI H, et al. Elevation of *Kiss2* and its receptor gene expression in the brain and pituitary of grass puffer during the spawning season[J]. Gen Comp Endocrinol, 2010, 169(1): 48–57.
- [16] SHIMIZU Y, TOMIKAWA J, HIRANO K, et al. Central distribution of *Kiss2* neurons and peri-pubertal changes in their expression in the brain of male and female red seabream *Pagrus major* [J]. Gen Comp Endocrinol, 2012, 175(3): 432–442.
- [17] 柯鸿文. 一种优良淡水鱼——团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 的繁殖和饲养[J]. 水生生物学集刊, 1975, 5(3): 293–314.
- [18] 李思发. 鱼类良种介绍——团头鲂浦江1号[J]. 中国水产, 2001(11): 52.
- [19] 施琰芳, 尹伊伟, 胡传林, 等. 鲢鱼性腺周年变化的研究[J]. 水生生物学集刊, 1964, 5(1): 77–94.
- [20] SEMINARA S B, MESSENGER S, CHATZIDAKI E E, et al. The *GPR54* gene as a regulator of puberty[J]. N Engl J Med, 2003, 349(17): 1614–1627.
- [21] KAUFFMAN A S, CLIFTON D K, STEINER R A. Emerging ideas about kisspeptin-*GPR54* signaling in the neuroendocrine regulation of reproduction[J]. Trends Neurosci, 2007, 30(10): 504–511.
- [22] ROA J, VIGO E, CASTELLANO J M, et al. Hypothalamic expression of *Kiss-1* system and gonadotropin-releasing effects of kisspeptin in different reproductive states of the female rat [J]. Endocrinology, 2006, 147(6): 2864–2878.
- [23] OKUZAWA K. Puberty in teleosts [J]. Fish Physiol Biochem, 2002, 26(1): 31–41.