科学通报 2013 年 第 58 卷 第 2 期: 103 ~ 114
自然科学基金项目进展专栏 评 述 www.scichina.com csb.scichina.com
《中国科学》杂志社 SCIENCE CHINA PRESS

鱼类生殖发育调控研究进展

陈戟, 胡炜*, 朱作言

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, 武汉 430072
* 联系人, E-mail: huwei@ihb.ac.cn

2012-06-19 收稿, 2012-09-28 接受
国家自然科学基金(30930069)、中国科学院知识创新重要方向性项目(KSCX2-EW-N-004)和国家高技术研究发展计划(2011AA100404)资助

摘要 动物生殖发育机制一直是生命科学的重要研究课题之一. 鱼类的生殖发育及其调控机制研究不仅具有重要的理论意义, 而且在指导鱼类品种改良上具有广泛的应用前景. 本文评述了鱼类性别决定和分化、生殖细胞和性腺发育以及生殖发育调控策略等方面的研究进展. 由于鱼类在动物演化中承上启下的地位、丰富的物种多样性和几乎具有所有脊椎动物生殖策略等特点, 以鱼类为模型可望取得动物生殖调控机制研究的重要突破, 并由此建立鱼类生殖开关和性别控制开关等生殖操作新技术, 为鱼类养殖品种培育技术打开一扇新的大门.

关键词
鱼类
生殖
调控

作为低等的脊椎动物, 鱼类在动物系统演化中处于承前启后的地位. 已知的鱼类有 28000 种之多, 具有极为丰富的物种多样性. 鱼类庞杂的生殖策略, 几乎涵盖了脊椎动物界的所有生殖类型. 鱼类生殖发育调控研究, 对于阐明动物生殖发育机制具有非常重要的理论意义. 不仅如此, 在鱼类重要经济性状(如生长、抗病、耐寒和耐低氧等)的相关基因和分子调控网络逐渐被人们发现后, 分子育种成为未来加快培育优良经济性状鱼类品种的主要手段之一[1], 而生殖是优良养殖鱼类新品种培育和扩群应用的基础. 性别控制育种、育性控制育种已经在培育优良养殖鱼类新品种方面发挥了重要作用. 为此, 本文简要综述了鱼类生殖发育调控研究的进展, 以期为阐明鱼类生殖发育机制提供启示, 并为进一步建立新的鱼类生殖操作技术, 培育优质、高产、高效和环境友好的优良养殖鱼类新品种提供理论参考.

1 鱼类的性别控制

1.1 影响鱼类性别的因素

鱼类性别分化模式和性别决定机制存在多样性. 鱼类的性别表型包括雌雄同体、单性别、雌雄异体以及同时存在单性和有性双重生殖的种类等[2]; 性染色体决定型存在 XX/XY, ZZ/ZW, XX/XO, ZZ/ZO 等, 以及复合性染色体类型如 XX/XY_1Y_2, ZZ/ZW_1W_2, $X_1X_2X_1X_2/X_1X_2Y$, $X_1X_2X_1X_2/X_1X_2X_1$ 等. 与其他动物一样, 鱼类性别分化从根本上受基因控制, 但鱼类是卵生, 在变温水环境中发育和生长, 因而鱼类性别的分化方向不可避免地受诸多环境因素的影响.

(ⅰ) 基因型性别决定. 脊椎动物参与性别决定和分化的基因总是向异配的性染色体上集中, 这可能是性别决定基因的共性[3,4]. 从性染色体上寻找性别决定基因成为鱼类性别决定机制研究的首选策略. Arkhipchuk[5]1995 年的统计结果表明, 在进行过细胞遗传学分析的 2700 种鱼类中, 仅有 176 种观察到异配型性染色体. 这些存在明显异配型性染色体的鱼类, 为探索鱼类性别决定机制提供了重要材料. Traut 和 Winking[6]在电子显微镜下观察到孔雀鱼(*Poecilia reticulata*)精母细胞性染色体有滞后配对的现象, 并通过比较基因组杂交的方法证实了 Y 染色体上不配对的区域是雄性特异的区域; Artieri 等人[7]以性别连锁的微卫星标记为探针, 确定大西洋鲑(*Salmo salar*)

引用格式: 陈戟, 胡炜, 朱作言. 鱼类生殖发育调控研究进展. 科学通报, 2013, 58: 103–114
英文版见: Chen J, Hu W, Zhu Z Y. Progress in studies of fish reproductive development regulation. Chin Sci Bull, 2013, 58: 7–16, doi: 10.1007/s11434-012-5577-1

的 2 号染色体为性染色体, 并进一步把性别决定基因锁定在 2 号染色体长臂位于标记 Ssa202DU 和一段异染色质之间的区域, 随后对这段区域测序, 以期找到性别决定基因; Zhao 等人[8]显微分离了刺鳅(*Mastacembelus aculeatus*)的 X 染色体, 通过简并引物 PCR(DOP-PCR)法建立了 X 染色体文库, 分离到 5S rDNA 相关的序列, 并发现该序列在刺鳅 X 和 Y 染色体上的分布区域不同. 但是, 异配型性染色体上通常存在包含大量重复序列的异染色质区, 给性别决定基因的分离带来困难. 如何从鱼类的性染色体上锁定性别决定基因所在区域, 并从繁多的重复序列信息中甄别性别决定相关基因, 是利用鱼类性染色体开展性别决定机制研究能否取得突破的关键.

通过其他物种性别决定基因的比较研究, 分析鱼类基因组中的同源基因, 是寻找鱼类性别决定基因的另一种策略. 可是, 参与哺乳动物性别决定的基因 *wt1*, *sf-1*, *amh*, *dax1* 等, 在鱼类中有同源基因, 却只是对鱼类雌雄信号通路有间接的调控作用, 而与鱼类性别决定无直接关系[9~12].

斑马鱼(*Danio rerio*) *ff1d* 基因是哺乳动物 *sf-1* 的同源基因, 它在下丘脑和性腺表达, 其中在精巢的 Sertoli 细胞和 Leydig 细胞中表达量较高, 可能调节 *amh* 的表达[10]. 斑马鱼 *amh* 基因主要在 Sertoli 细胞中表达, 可能受 SF-1, GATA-4 和 WT1 等调控, 并与精细胞的增殖和分化有关[13]. *cyp19* 基因编码把雄激素转化为雌激素的芳香化酶 P450. 鱼类 *cyp19a1* 直接参与卵巢发育, *cyp19a2* 可能通过下丘脑-垂体-性腺轴(hypothalamic-pituitary-gonadal axis, HPG 轴)参与性别分化[14]. 本实验室分析了 *cyp19a1a* 和 *cyp19a1b* 在鲤鱼(*Cyprinus carpio*)性腺不同发育阶段的表达特征, 认为 *sf-1* 和 *cyp19b* 可能共同参与鲤鱼精巢的早期分化过程, 而 *cyp19a* 可能参与鲤鱼卵巢的分化过程[15]. Guiguen 等人[16]认为, *cyp19a1a* 的上调表达启动卵巢分化和维持卵巢功能, 而精巢分化的信号通路与 *cyp19a1a* 的下调密切相关. 此外, *cyp19a1* 的表达调控因子包括 SF-1, FOXL2 和 AMH[17], 再次提示这几个因子在鱼类性别决定中的间接作用.

SOX 基因家族结构在脊椎动物中高度保守, 参与广泛的生物发育调控过程. 然而鱼类的 *SOX* 同源片段没有保守的性别决定功能. *sox9* 基因在某些鱼种中表现出了雌雄不同的表达模式[18], 可能参与精巢器官的形成, 但是并没有决定性别的功能.

DMRT 家族的很多成员都可能与性别发育有关, 有学者认为, *dmrt1* 基因可能是脊椎动物中最原始的性别决定基因. *dmrt1* 基因仅仅在鱼类的性腺中特异表达, 且在许多鱼中的精巢表达量高于卵巢表达量, 可能与精巢的形成和功能维持有关. 本实验室通过半定量 PCR 分析了稀有鮈鲫(*Gobiocypris rarus*)个体发生过程中 *dmrt1* 的表达, 发现从出苗后 5 d, 精巢的 *dmrt1* 表达量就高于卵巢[19].

青鳉(*Oryzias latipes*)的 *DMY* 基因由 *dmrt1* 复制而来, 是迄今在鱼类 Y 染色体上找到的、与精巢发生及分化直接相关证据最充分的一个性别决定功能基因[20,21]. 但随后的种系发生(phylogenetic)分析表明, 青鳉的 *DMY* 发生在青鳉与其他鳉科鱼类分开之后, 是演化上出现比较晚的一个特异基因, 在其他鱼类中不存在.

最近, Hattori 等人[22]在牙汉鱼(*Odontesthes hatcheri*)中分离到 *amh* 在 Y 染色体上的复制基因 *amhy*, 时空表达分析和敲降实验暗示 *amhy* 很可能是决定牙汉鱼性别的关键基因. 与 *sry*, *dmrt1* 和 *DMY* 等决定性别的编码转录因子不同, *amhy* 是目前发现的唯一一个在脊椎动物性别决定中起重要作用的激素相关基因.

Li 等人[23]通过 FISH 发现, 即使是同属鲑科(Salmonidae)的褐鳟(*Salmo trutta*)、大西洋鲑(*Salmo salar*)和虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*), 其性染色体起源也不相同, 性别决定基因不一样. Vandeputte 等人[24]认为, 在狼鲈(*Dicentrarchus labrax*)中存在多基因性别决定系统. Bradley 等人[25]对斑马鱼基因组进行 SNP 位点分析, 发现分别处于 2 个连锁群的 2 个位点与性别分化有关, 其中一个是 *dmrt1* 基因位点, 另一个是 *cyp21a2* 基因位点. 但是随后的研究发现, 这 2 个位点突变导致性别改变的斑马鱼比例之和大约只有 16%. Liew 等人[26]通过不同品系斑马鱼之间的杂交, 发现斑马鱼的性别主要由遗传因素决定, 但无论是用 FluoMEP 筛选, 还是用芯片比较基因组杂交的方法, 都没有发现雌雄斑马鱼基因组之间的性别连锁差异, 他们认为是多基因系统决定了斑马鱼的性别.

从上述研究可以看出, 大多数的鱼类似乎还没有充分特化的性别决定或分化基因, 其性别的形成(包括性反转)有多个基因参与, 而且受环境等诸多因素的制约, 因而不同鱼类呈现着多样的性别决定分

子机制.

(ⅱ) 环境型性别决定. 鱼类性别的分化方向受温度、外源激素等环境因素的影响, 甚至还有行为控制[27].

温度是自然环境中对鱼类性别决定起较大作用的因素. 1981 年, Conover 和 Kynard[28]发现月银汉鱼(*Menidia menidia*)的性别决定由遗传和环境因素在仔鱼发育的某个阶段共同控制. 随后的研究表明, 很多鱼类的性别受基因和环境双重调控. 在一些极端条件下, 温度甚至能凌驾于基因型上导致性别转变. Hayashi 等人[29]观察到, 在 32~34℃的高温条件下, 青鳉全身的皮质醇含量升高, 影响生殖细胞增殖和卵泡刺激素(FSH)受体表达, 从而导致 XX 型青鳉雄性化. 不同种类的鱼对温度的反应不同, 对温度敏感的大部分种类处于较高温度(23~29℃)环境时雄性比例增加[30], 而食蚊鱼(*Gambusia affinis*)和霍氏白鲑(*Coregonus hoyi*)等鱼的性别则完全不受温度影响[31]. Yamaguchi 等人[32]探索了温度影响鱼类性别的分子机制, 发现牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)的 *foxl2* 基因和 FSH 受体基因的表达随温度升高而降低, 推测温度可能通过间接影响 *cyp19a1* 的转录促进雄性分化.

鱼类性腺分化可受性激素的定向诱导已被公认. 大多数情况下, 在鱼类性别决定的早期(胚胎发育阶段), 激素短期处理即能持续稳定地控制性别表型. 但持续的性激素处理可能会导致性腺发育不全或不育[33]. 此外, 用雄激素 17-MT (17α-methyltestosterone)处理银大马哈鱼(*Oncorhynchus tshawytscha*)会导致其雌性化, 可能是 17-MT 被芳香化后仍能被雌激素受体识别继而发生雌性分化[34].

需要指出的是, 通常所说的“雌激素”是指雌性个体特有的激素, 近年来的一些研究结果颠覆了这一观点. 鳗鲡鱼(*Acanthogobius flavimanus*)雄鱼精巢体细胞中, 甚至单倍体精细胞中都有雌激素受体表达[35], 暗示雌激素在雄性生殖细胞发育中可能有调控作用. Chaves-Pozo 等人[36]用超过生理浓度的雌激素 E2 (17β-estradiol)处理乌颊鱼(*Sparus aurata* L.), 发现 E2 能抑制生殖细胞增殖, 引起未分化的精原细胞凋亡并促进生精过程. 而 Miura 等人[37]发现 DHP (17-α,-20-β-dihydroxy-4-pregnen-3-one)参与鳗鱼(*Anguillar japonica*)精母细胞的减数分裂. 因此, 雌激素也在雄性个体性腺发育及成熟过程中发挥作用. 另一方面, Liu 等人[38]发现倒刺鲃(*Spinibarbus denticulatus*)的卵巢也表达雄激素受体 mRNA, 暗示雄激素在雌性个体性腺发育中也可能发挥作用. 因此, 鱼类的性腺发育可能需要雌激素和雄激素共同发挥作用, 雌、雄激素之间的平衡协调将决定性腺分化的方向.

在某些鱼类中, 存在着“社会控制”现象, 即种群内某些个体可以通过其行为控制其他个体的性别分化. 具有行为性别转换的鱼类的“社会”通常是由一群具相同性别的年幼个体和少数性别相反的较大支配个体组成. 当支配个体离开群体或无法控制其他个体时, 处于第二位的个体就会转换性别, 以替代原有支配个体的角色[39].

1.2 鱼类的性反转

某些鱼类中存在特殊的天然性反转现象, 石斑鱼 (*Epinephelussp*) 、真鲷 (*Pagrus major*) 和黄鳝 *(Monopterus albus*)等鱼类的性转化是个体发育的必经事件, 性逆转的分子机制一直是鱼类生殖发育研究领域一个经典又有趣的课题. Bhandari 等人[40]认为, 雌雄同体种类的个体大小与年龄及性别有重要关系, 它们总是保持繁殖力较高的性别形式. *dmrt1* 基因和 SOX 基因家族可能在鱼类由雌转雄的性反转过程中具有重要作用. Zhou 等人[41]构建了斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)性腺不同发育阶段的下丘脑、垂体和性腺 cDNA 文库, 鉴定出 10 多个与石斑鱼性反转相关的基因, 其中 *dmrt1* 基因被认为在石斑鱼的精原细胞分化成精母细胞过程中发挥重要作用, *sox3* 基因有调控卵子发生的作用; Alam 等人[42]分析了蜂巢石斑鱼(*Epinephelus merra*)由雌转雄时 *dmrt1* 和 *foxl2* 基因的表达量, 认为 *foxl2* 的下调表达加速了卵巢的降解, 而 *dmrt1* 的上调表达促使生殖细胞分化成精细胞并开始性反转; Huang 等人[43]发现, 黄鳝的 *dmrt1* 基因在性腺中表达时存在选择性剪接事件, 其中两个转录本的表达量随着性腺由雌变雄而逐步升高; 本实验室研究了人工性反转前后斜带石斑鱼 *sox9* 基因的表达特征, 认为 *sox9* 是启动和维持其雄性化的重要因子之一[44]. 天然性反转鱼类为研究动物性别决定与分化机制提供了一个独特的实验材料.

精巢、卵巢的发育和维持都需要性激素的参与. 在鱼类性反转的过程中, 多种性激素含量也相应发生了变化. Kokokiris 等人[45]发现赤鲷(*Pagrus pagrus*)在由雌变雄的过程中, 血清中雄激素 11-ketotestosterone (11-KT)和 testosterone (T)的含量逐渐升高, 而

雌激素 estrone (E1)和 17β-estradiol (E2)急剧下降. 与此相反, 黑鲷(*Acanthopagrus schlegeli*)在由雄变雌的性反转过程中, 血清 E2 的含量逐渐升高[46]. 显然, 性激素在鱼类性反转过程中具有非常重要的作用. 采用人工浸泡或直接投喂性激素的方式处理实验鱼, 进一步证实性激素在鱼类性别分化中的作用. Li 等人[47]把 MT, MDHT (non-aromatizable 17α-methydihydrotestosterone)和 MT+AI (芳香化酶抑制剂)分别植入赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*)体内一个月, 获得了性腺既含封闭卵泡的卵细胞又含各发育时期精细胞的兼性鱼. Kojima 等人[48]用 E2 喂食三斑海猪雄鱼(*Halichoeres trimaculatus*), 12 周后获得了完全成熟的雌鱼; Bhandari 等人[49]把 11-KT 植入雌性蜂巢石斑鱼腹腔, 75 天后诱导成 100%的雄鱼. *cyp19a1a* 编码的芳香化酶是把某些雄激素转化为雌激素的关键酶, 用芳香化酶抑制剂处理, 也可以导致赤点石斑鱼发生由雌变雄的性反转[50]. Guiguen 等人[16]提出假说, *cyp19a1a* 和内源的雌激素是鱼类天然性反转的关键因素, 其表达量的降低启动由雌性向雄性转变, 反之, 则启动由雄性向雌性转变.

石斑鱼和黄鳝都是雌雄同体、雌性先成熟的重要经济鱼类. 生产实践中, 石斑鱼天然性反转发生的迟缓导致雄性亲鱼缺乏; 而黄鳝天然性反转很早就发生, 常常造成雌性亲本个体小而怀卵量少. 如果建立鱼类精细的体内性激素含量调控技术, 使石斑鱼性反转的时间提前, 或使黄鳝性反转的时间推迟, 对于这两种重要经济鱼类养殖产业的发展具有重要意义.

1.3 性控育种

很多鱼类具有生长速度或性成熟年龄的性别差异, 摄取的能量在性成熟前主要用于躯体生长. 鲤鱼等因卵巢成熟较精巢晚, 所以雌性生长速度较快; 黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)和罗非鱼(*Tilapia*)等则是雄性具有明显的生长优势. 同时, 繁殖能力强的罗非鱼等, 雌、雄鱼混养时会造成养殖后期大量产苗, 影响养殖效益. 因此, 通过性别控制技术培育全雌或者全雄的养殖品种具有重要的应用价值. 利用鱼类可以人工性逆转的特性, 通过激素诱导并结合人工雌核发育等处理, 目前已成功培育出全雌的鲤鱼和全雄黄颡鱼[51,52].

雌激素在鱼类性别分化中具有重要作用, 是鱼类卵巢分化的天然诱导剂[11,53]. 雌激素合成的量与催化其合成的关键酶——芳香化酶的表达水平密切相关, 有学者尝试通过调控芳香化酶的表达控制雌激素水平, 从而影响性别分化来控制鱼类性别.

Wang 等人[54]在雌性罗非鱼中转入过表达的 *dmrt1* 基因抑制编码芳香化酶的 *cyp19a1a* 基因的转录活性后, 发现转基因罗非鱼血清中的 E2 含量降低, 卵巢发育延迟, 滤泡发生了不同程度的退化, 约 5%的个体发育为完全雄性. FOXL2 在雌性鱼中通过上调 *cyp19a1a* 的表达, 促进雌激素的合成, 有助于卵巢的发育. Wang 等人[17]在雌性罗非鱼中过量表达 *foxl2* 的负显性突变体(dominant negative mutant)干扰内源性 FOXL2 的功能, 抑制转基因鱼性腺的 *cyp19a1a* 基因的表达, 降低转基因鱼血清雌激素水平, 实现罗非鱼由雌性向雄性方向逆转. Rodriguez-Mari 等人[55]用 *Tol2* 转座子插入斑马鱼的 *fancl* 基因编码区使其失活, 斑马鱼在性腺分化时发生生殖细胞凋亡, 卵细胞无法存活, 同时 *cyp19a1a* 的表达量降低, 结果性腺发育成精巢, 得到 100%的雄性斑马鱼. 上述研究表明, 通过控制雌雄分化信号通路中重要信号分子的表达, 可以达到控制性别的目的, 并有望发展成为一种鱼类性控育种新技术.

还有研究表明, 敲降原生殖细胞(PGC)发育和迁移相关基因 *dnd* 的表达后导致原生殖细胞凋亡, 性腺缺少生殖细胞的斑马鱼或青鳉, 会发育成雄性, 能追逐雌鱼排卵[56,57].

2 鱼类的育性控制

鱼类的生长和生殖密切联系[58], 通过生殖操作技术控制鱼类育性, 将减少生殖能的分配, 从而培养出快速生长的品种. 同时, 生态风险已成为制约引进外来优良品种和转基因鱼产业化的瓶颈因素, 研制鱼类不育策略, 可以从根本上解决引种研制和转基因鱼应用的生态安全问题[59,60]. 育性控制对于鱼类品种改良及转基因鱼育种研究的可持续深入进行具有重要意义.

2.1 鱼类的性腺发育

(ⅰ) 鱼类生殖细胞的发育. 鱼类的生殖发育过程包括原始生殖细胞的发生、迁移、分化和配子形成[61]. *vasa* 是鱼类中第一个被确定为生殖细胞特异表达的基因[62]. 利用生殖细胞特异表达基因的启动子或 3′-UTR 将生殖细胞标记荧光后[63], 不仅可跟踪性

腺的形成过程，而且结合基因敲降/敲除技术，有助于发掘调控性腺发育的新因子.

Raz 和 Hopkins[64]用 *vasa* 基因的探针对斑马鱼胚胎进行原位杂交，发现在 2 细胞期和 4 细胞期时，4 个 VASA 信号点分布在分裂沟. 在随后的卵裂胚胎中，直至 1k 细胞期之前，斑马鱼胚胎的原始生殖细胞(PGC)数都是 4 个且分布位置不变. 本实验室研究了稀有鮈鲫 *vasa* 基因的表达特征，发现其时空表达模式及胚胎发育中的分布特征与斑马鱼的 *vasa* 基因表达特征类似[65]. 而青鳉的 *vasa* RNA 在早期胚胎细胞中广泛分布，原肠晚期才表现出特异分布，约 10~25 个 *vasa* RNA 阳性细胞集中在胚盾后部约 1/3 处的胚胎轴两侧[66]. *vasa* 基因的两种不同表达特征提示鱼类生殖细胞发生模式的多样性.

斑马鱼 PGC 的迁移从囊胚期开始, E 型钙黏蛋白合成减少，生殖细胞重新转录一些基因, RNA 结合蛋白 DND 在此转录过程中起关键作用[67]. 此时，生殖细胞变得有极向，表面的受体 CXCR4 可以接受趋化因子 SDF1a，导致生殖细胞向有该因子的方向迁移. 在生殖细胞迁移路径上和胚胎性原基的体细胞依次表达 SDF1a，以此引导 PGC 迁移到达最终目的地[68]. CXCR7 是体细胞的另一种 SDF1a 受体, CXCR7 的有序表达可消除多余的 SDF1a 从而引导生殖细胞迁移方向[69].

与斑马鱼类似，青鳉 PGC 的迁移由 SDF1a 和 SDF1b 联合引导[70]. Kunwar 等人[71]认为, G 蛋白偶联受体参与，进行方向性诱导或排斥，可能是普遍存在的 PGC 迁移机制. PGC 迁移到达目的地后，一部分进行有丝分裂以维持生殖干细胞的数目，另一部分分化发育成精/卵母细胞，进入减数分裂，最终形成配子.

目前发现的与鱼类生殖细胞分化相关的因子并不多. Herpin 等人[72]发现 DMY 使 XY 型青鳉生殖细胞周期停滞在 G2 期，对分化有抑制作用; Shiraishi 等人[73]发现, MIS 蛋白通过影响生殖细胞周围的体细胞来促进生殖细胞分化; 斑马鱼 PIWI 蛋白结合生殖细胞特异表达的 piRNA，对于生殖细胞的维持和分化有重要作用[74].

与生殖细胞成熟相关的因子有垂体激素、性激素和生长因子等. 垂体激素包括卵泡刺激素(FSH)、促黄体生成素(LH)和生长激素(GH)等. 性激素包括孕酮、雄激素和雌激素等. 生长因子包括活化素(activin), GSDF, AMH, IGF-1 等. 详细的综述请见 Schulz 等人[75]和 Lubzens 等人[76]的研究.

(ⅱ) 鱼类性腺发育的内分泌调控. 性腺的发育和成熟受基因表达及环境影响等多因素综合作用，涉及众多信号的分子网络调控. 与其他脊椎动物类似，神经内分泌系统中的 HPG 轴对鱼类性腺发育起主导调控作用. 促性腺激素释放激素(GnRH)是 HPG 轴的上游关键因子. 下丘脑分泌的 GnRH 通过神经元到达垂体，垂体中促性腺激素(GtH)分泌细胞内的 cAMP 信号通路被激活，促进转录、合成和分泌 FSH 和 LH. FSH 和 LH 经由血液循环进入性腺，通过激活性类固醇激素的生成，进而调节性腺发育并促进最后的性成熟. 性类固醇激素又能通过负反馈抑制下丘脑 GnRH 的合成.

近年来，正向调控 GnRH 的 kisspeptin 和负向调控 GnRH 的 GnIH 的发现，被誉为脊椎动物神经内分泌研究领域的两大里程碑式突破[77]，它们已成为鱼类生殖生理研究领域的热点.

Kisspeptin 是由 *kiss* 基因编码的一种神经肽，其受体 GPR54 为 G 蛋白偶联受体. de Roux 等人[78]在人类病理研究中发现，编码 GPR54 的基因突变后，患者的性功能减退，青春期启动推迟. 随后在小鼠、大鼠和猴等哺乳类的研究中进一步发现了 kisspeptin 及其受体 GPR54 在生殖发育中的功能. 目前认为，kisspeptin 参与的生理调节包括脑的雌雄分化信号通路; 青春期启动; GnRH 的分泌和释放; 性激素反馈信号的传导; 光信号调控生殖信号通路[79].

近年来，kisspeptin 及 GPR54 在鱼类生殖中的功能研究业已兴起. Parhar 等人[80]在罗非鱼的研究中发现, GnRH 神经元中存在 GPR54 mRNA 的表达，提示 kisspeptin 直接作用于 GnRH 神经元. Kitahashi 等人[81]克隆和表达了斑马鱼和青鳉的 *kiss2* 基因，通过腹腔注射和荧光定量 PCR，发现 *kiss2* 在斑马鱼性激素合成调节中的作用比 *kiss1* 更重要. Li 等人[82]向金鱼(*Carassius auratus*)腹腔注射 kisspeptin 成熟肽后，金鱼血清中的 LH 含量升高; 但 Pasquier 等人[83]发现 kisspeptin 对欧洲鳗鲡(*Anguilla anguilla*)LH 的表达有直接抑制作用. 值得注意的是，鱼类中通常同时存在 2 种甚至 3 种 GnRH，鱼类中也发现同时存在 2 种 kisspeptin 和 GPR54. 因此，鱼类 kisspeptin/GPR54 信号系统及其与 GnRHs 间的相互作用和对鱼类生殖的调控可能存在有别于哺乳类的独特机制.

2000 年，日本学者首先在鸟类中发现具有抑制

垂体前叶细胞促性腺激素分泌功能的神经肽——释放促性腺激素抑制激素(gonadotropin-inhibitory hormone, GnIH). 随后的研究发现, GnIH 对于鸟类和哺乳类生殖的调控可能作用于 HPG 轴的各个层次: 抑制 LH 和 FSH 的合成和释放, 诱导精巢细胞的凋亡, 对于性腺类固醇激素的产生及生殖细胞的分化和成熟也可能具有潜在的自分泌和旁分泌(autocrine/paracrine)的调节作用[84]. 但鱼类 GnIH 的功能研究刚刚起步, 而且现有研究存在诸多不一致的结果. Zhang 等人[85]将斑马鱼 GnIH 多肽注射到性成熟的雌性金鱼腹腔内后, 实验鱼血清中的 LH 水平下降, 表明 GnIH 负向调控金鱼 LH 的释放. 但是, Moussavi 等人[86]将 GnIH 注射到不同性腺发育时期的金鱼腹腔, 发现从性腺再成熟的早期到晚期, GnIH 上调垂体 LH-β 亚基和 FSH-β 亚基的 mRNA 水平, 但是降低血清中 LH 和垂体中 GnIH 受体的 mRNA 水平. 他们认为, GnIH 对 LH 和 FSH 有季节性的调控作用. GnIH 在鱼类生殖中的功能研究及新的 GnRH 负向调控因子的发掘将可能改变我们对于鱼类生殖轴调控的理解和认识.

此外, 还有多种分子通过影响 HPG 轴来间接调控性腺发育, 如多巴胺(DA)在多种硬骨鱼中抑制 GtH 的释放[87]、神经肽 Y(NPY)刺激 GtH 的分泌[85]. γ-氨基丁酸(GABA)促进 GtH 的释放[88]等. 本实验室以性腺败育的雌性鲤鱼和正常鲤鱼为材料, 利用差减抑制杂交(SSH)和 cDNA 基因芯片技术, 从下丘脑、垂体和性腺 3 个层次筛选出共 200 多个差异表达的基因, 其中包括了 87 个功能未知的新基因, 而一些已知基因的功能涉及到生长、器官生成、能量代谢、免疫应答、信号传导和细胞凋亡等[89], 可见鱼类性腺发育受相当复杂的分子网络调控.

2.2 育性控制策略

GnRH 是 HPG 轴的关键信号分子, 诸多实验室尝试通过控制 GnRH 基因的表达来控制鱼类育性[90,91]. 本实验室采用反义转基因技术抑制内源 sGnRH 基因的表达, 获得了性腺完全不发育的转基因鱼[89,92]. 因此, 抑制鱼类性腺发育重要信号分子的表达可以控制鱼类育性.

性腺的发育是生殖细胞发生、迁移、分化和发育成成熟配子的过程. 干扰与生殖细胞发育相关基因的表达, 可以导致生殖细胞凋亡而不育. 采用 morpholino 敲低 *dnd* 基因表达后, 斑马鱼的 PGC 迁移能力下降, 继而发生凋亡[93]; *nanos1* 基因表达被抑制后, 斑马鱼 PGC 无法正常迁移, 并且 PGC 数目减少[94]; Ramasamy 等人[95]把斑马鱼 *stau* 基因敲降后, PGC 迁移异常, 最终凋亡; *zili* 基因缺失的斑马鱼, 其生殖细胞会在减数分裂前凋亡[74].

以生殖细胞为对象进行育性控制的另外一种策略是直接特异地杀死生殖细胞. Slanchev 等人[56]在斑马鱼全身泛组织表达解毒剂 kis, 同时通过 *nos* 3'-UTR 定位, 使原核细胞毒素 kid 在斑马鱼生殖细胞中高水平特异表达, 从而获得生殖细胞凋亡而其他组织正常发育的胚胎; Hsu 等人[96]和 Hu 等人[97]通过卵细胞特异表达的 *zp* 启动子或精细胞特异表达的 *asp*, *odf*, *sam* 启动子使硝基还原酶特异表达于斑马鱼生殖细胞, 转基因鱼经甲硝唑浸泡后, 生殖细胞中的硝基还原酶把甲硝唑转变成细胞毒素, 转基因鱼的性腺因生殖细胞凋亡而明显萎缩. 但必须指出的是, 这些技术涉及到细胞凋亡或细胞毒理. 从食品安全的角度而言, 如何既特异有效地消除生殖细胞、又不影响体细胞的生长, 并且体细胞中无毒性蛋白表达, 是该策略应用于鱼类育种前必须解决的问题.

3 鱼类生殖的细胞工程操作技术

鱼类生殖的细胞工程操作技术有生殖细胞移植技术和干细胞诱导技术.

模式动物斑马鱼及青鳉的细胞核移植技术已先后建立[98~100]. 最近, Liu 等人[101]建立了青鳉精子细胞核移植技术, 用表达红色荧光蛋白(RFP)质粒的溶液浸泡精子后, 把精子的细胞核植入未受精卵中, 50%的移核胚胎表达荧光蛋白, 约 5%的移核胚胎发育至性成熟, 这种生殖细胞核移植技术可能发展成为一种有效的转基因方式. 但是, 由于供体核的再程序化不完全, 目前核移植成功率较低, 细胞核移植技术体系有待完善. 本实验室在斑马鱼的体细胞核移植研究中发现, 囊胚期和原肠胚期是核移植细胞再程序化的关键时期, *mycb* 和 *klf4* 基因的正常表达与否是斑马鱼重构胚能否顺利发育的重要因素[102,103].

鱼类的“借腹怀胎”技术, 是指将一种鱼的原始生殖细胞移植到另一种鱼体内, 被移植的供体原始生殖细胞可以在受体鱼中独立发育或参与发育成性腺, 并能产生成熟的供体鱼类型的配子. 基于探索有效的基因转移方法, Takeuchi 等人[104]建立了鱼类的

“借腹怀胎”技术, 此后该技术被不断改进和完善. Saito 等人[105]用 *dnd* morpholino 杀死斑马鱼囊胚期的生殖细胞后, 植入珍珠但尼鱼(*Danio albolineatus*)的单个原生殖细胞. 植入的生殖细胞随着胚胎的发育迁移到性腺的形成部位, 形成单侧性腺并能产生有功能的配子. Saito 等人[106]随后又比较了移植单个原生殖细胞以及移植胚叶团的一团细胞之间的成功率, 认为原生殖细胞的迁移机制在不同鱼之间高度保守, 移植单个原生殖细胞的成功率明显高于移植细胞团; Nobrega 等人[107]把斑马鱼精原干细胞移植到雄鱼和雌鱼中, 分别观察到了生精和生卵现象, 从另一个角度说明了生殖细胞分化受其环境影响; Majhi 等人[108]报道, 把银汉鱼(*Odontesthes bonariensis*)的生殖细胞移植到性成熟的巴塔哥尼亚银汉鱼(*O. hatcheri*)体内, 6 个月后, 移植的生殖细胞开始产生精子, 相比于未移植生殖细胞的银汉鱼, 缩短了繁殖的周期. 令人兴奋的是, 经济性鱼类鲑鱼和虹鳟间以及两种罗非鱼间的“借腹怀胎”已获成功[109,110]. 这些研究表明, 不同种鱼之间的“借腹怀胎”技术已经日趋成熟, 对于缩短经济鱼类的育种周期和保护珍稀鱼类具有重要应用价值.

干细胞离体培养技术的出现, 极大地方便了动物个体水平的基因操作. 然而目前已获得的鱼类干细胞不多. 青鳉的胚胎干细胞已成系并传代稳定、可形成胚胎嵌合体[111,112]. Chen 等人[113]报道了几种海水鱼的胚胎干细胞系, 可形成胚胎嵌合体. 斑马鱼的胚胎干细胞在体外维持一段时间后发生分化失去了多能性[114]. 引人关注的是, Yi 等人[115]获得了青鳉单倍体胚胎干细胞系, 该细胞系能一直维持干细胞特征, 可与二倍体细胞一起形成胚胎嵌合体, 甚至可核移植到正常卵中发育成可育的性成熟鱼. 该研究开创了动物半克隆技术, 证明单倍体胚胎干细胞核能模拟精子授精并生成后代, 是生殖生物学的一个新突破.

鱼类生殖干细胞培养技术集中在精原干细胞的分离及培养. 第一个建立的鱼类精原干细胞系来自青鳉, 并且它能被诱导分化发育成精子, 参与形成合子[116]. Sakai[117]描述了斑马鱼精原细胞的分离培养方法, 随后 Fan 等人[118]用流式细胞仪分离得到转 RFP 的斑马鱼精原细胞并进行了 4 个月的体外培养; Shikina 和 Yoshizaki[119]用类似的方法分离到虹鳟的精原干细胞; Panda 等人[120]报道, 分离富集了露斯塔野鲮(*Labeo rohita*)的精原干细胞并能维持未分化状态. 鱼类卵原干细胞培养至今尚无报道, 最近才观察到青鳉卵巢中的卵原干细胞[121]. 鱼类生殖干细胞的体外培养和诱导分化技术, 将可能为鱼类育种方法提供新的思路.

4 总结及展望

现存鱼类约 28000 多种, 超过其他脊椎动物种类数量的总和, 鱼类具有承上启下的演化地位、多种多样的性征、涵盖脊椎动物的所有生殖策略等特点. 可以预见, 充分利用鱼类这些独有的特征, 以鱼类为模型可望取得动物生殖调控机制研究的重要突破.

越来越多的研究表明, 鱼类的生殖发育受一系列精细步骤调控, 由复杂的网络组成. 斑马鱼、青鳉等模式鱼和罗非鱼、草鱼等经济型鱼类全基因组的剖析, 将为大规模分离、鉴定控制鱼类生殖的功能基因、发掘调控生殖的重要信号通路和解析生殖调控的分子网络提供重要的信息.

鱼类的生殖是养殖鱼类新品种培育与扩群应用的前提. 尽管现有鱼类种类繁多, 但是能为水产养殖业所利用的优良养殖品种非常匮乏, 其根本原因之一就在于对鱼类生殖过程的机制缺乏透彻的了解, 众多具有优良经济性状的经济鱼类难以实施人工生殖操作, 因而难以培育成为优良的养殖品种. 建立鱼类的生殖开关和性别控制开关等生殖操作技术, 将为养殖鱼类新品种的培育打开一扇新的大门.

鱼类生殖操作技术实际上是生殖细胞的发生、维持和分化以及与周围细胞通讯互作的调控. 鱼类生殖开关和性别控制开关的建立依赖于生殖发育调控网络、性别决定与分化机理、生殖细胞生长发育机制等理论研究的突破; 依赖于鱼类基因组精细编辑技术、靶基因表达的强效稳定调控技术以及基因型与表型的精确和高效鉴定等技术的突破.

参考文献

1 Gui J F, Zhu Z Y. Molecular basis and genetic improvement of economically important traits in aquaculture animals. Chin Sci Bull, 2012, 57: 1751–1760

2 Gui J F, Zhou L. Genetic basis and breeding application of clonal diversity and dual reproduction modes in polyploidy *Carassius auratus gibelio*. Sci China Life Sci, 2010, 53: 409–415

3 van Doom G S, Kirkpatrick M. Turnover of sex chromosomes induced by sexual conflict. Nature, 2007, 449: 909–912

4 Ross J A, Urton J R, Boland J. Turnover of sex chromosomes in the stickleback fishes (gasterosteidae). PLoS Genet, 2009, 2: e1000391

5 Arkhipchuk V V. Role of chromosomal and genome mutations in the evolution of bony fishes. Hydrobiol J, 1995, 31: 55–65

6 Traut W, Winking H. Meiotic chromosomes and stages of sex chromosome evolution in fish: Zebrafish, platyfish and guppy. Chromosome Res, 2001, 9: 659–672

7 Artieri C G, Mitchell L A, Ng S H, et al. Identification of the sex-determining locus of Atlantic salmon (*Salmo salar*) on chromosome 2. Cytogenet Genome Res, 2006, 112: 152–159

8 Zhao G, Yu Q X, Zhang W W, et al. The 5S rDNA related repetitive sequences in the sex chromosomes of the spiny eel (*Mastacembelus aculeatus*). Cytogenet Genome Res, 2008, 121: 143–148

9 Lee B Y, Kocher T D. Exclusion of Wilms tumour (WT1b) and ovarian cytochrome P450 aromatase (CYP19A1) as candidates for sex determination genes in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Anim Genet, 2007, 38: 85–86

10 von Hofsten J, Larsson A, Olsson P E. Novel steroidogenic factor-1 homolog (*ff1d*) is coexpressed with anti-Mullerian hormone (*AMH*) in zebrafish. Dev Dyn, 2005, 233: 595–604

11 von Hofsten J, Olsson P E. Zebrafish sex determination and differentiation: Involvement of *FTZ-F1* genes. Reprod Biol Endocrinol, 2005, 3: 63

12 Nakamoto M, Wang D S, Suzuki A, et al. Dax1 suppresses P450arom expression in medaka ovarian follicles. Mol Reprod Dev, 2007, 74: 1239–1246

13 Rogriguez-Mari A, Yan Y L, Bremiller R A, et al. Characterization and expression pattern of zebrafish *Anti-Mullerian hormone* (*Amh*) relative to *sox9a*, *sox9b*, and *cyp19a1a*, during gonad development. Gene Expr Patterns, 2005, 5: 655–667

14 Sawyer S J, Gerstner K A, Callard G V. Real-time PCR analysis of cytochrome P450 aromatase expression in zebrafish: Gene specific tissue distribution, sex differences, developmental programming, and estrogen regulation. Gen Comp Endocrinol, 2006, 147: 108–117

15 Tang B, Hu W, Hao J, et al. Developmental expression of steroidogenic factor-1, cyp19a1a and cyp19a1b from common carp (*Cyprinus carpio*). Gen Comp Endocrinol, 2010, 167: 408–416

16 Guiguen Y, Fostier A, Piferrer F, et al. Ovarian aromatase and estrogens: A pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish. Gen Comp Endocrinol, 2010, 165: 352–366

17 Wang D S, Kobayashi T, Zhou L Y. Foxl2 up-regulates aromatase gene transcription in a female-specific manner by binding to the promoter as well as interacting with ad4 binding protein/steroidogenic factor 1. Mol Endocrinol, 2007, 21: 712–725

18 Vizziano D, Randuineau G, Baron D, et al. Characterization of early molecular sex differentiation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Dev Dyn, 2007, 236: 2198–2206

19 Cao M X, Duan J D, Cheng N N, et al. Sexually dimorphic and ontogenetic expression of *dmrt1*, *cyp19a1a* and *cyp19a1b* in *Gobiocypris rarus*. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2012, 162: 303–309

20 Matsuda M, Nagahama Y, Shinomiya A, et al. *DMY* is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. Nature, 2002, 417: 559–563

21 Nanda I, Kondo M, Hornung U, et al. A duplicated copy of *DMRT1* in the sex-determining region of the Y chromosome of the medaka, *Oryzias latipes*. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99: 11778–11783

22 Hattori R S, Murai Y, Oura M, et al. A Y-linked anti-Mullerian hormone duplication takes over a critical role in sex determination. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109: 2955–2959

23 Li J, Phillips R B, Harwood A S, et al. Identification of the sex chromosomes of brown trout (*Salmo trutta*) and their comparison with the corresponding chromosomes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Cytogenet Genome Res, 2011, 133: 25–33

24 Vandeputte M, Dupont-Nivet M, Chavanne H, et al. A polygenic hypothesis for sex determination in the European sea bass *Dicentrarchus labrax*. Genetics, 2007, 176: 1049–1057

25 Bradley K M, Breyer J P, Melville D B, et al. An SNP-based linkage map for zebrafish reveals sex determination loci. G3 (Bethesda), 2011, 1: 3–9

26 Liew W C, Bartfai R, Lim Z, et al. Polygenic sex determination system in zebrafish. PLoS One, 2012, 7: e34397

27 Devlin R H, Nagahama Y. Sex determination and sex differentiation in fish: An overview of genetic, physiological, and environmental influences. Aquaculture, 2002, 208: 191–364

28 Conover D O, Kynard B E. Environmental sex determination: Interaction of temperature and genotype in a fish. Science, 1981, 213: 577–579

29 Hayashi Y, Kobira H, Yamaguchi T, et al. High temperature causes masculinization of genetically female medaka by elevation of cortisol. Mol Reprod Dev, 2010, 77: 679–686
30 Roemer U, Beisenherz W. Environmental determination of sex in Apistogramma (Cichlidae) and two other freshwater fishes (Teleostei). J Fish Biol, 1996, 48: 714–725
31 Conover D O, Daemond S B. Absence of temperature dependent sex determination in northern populations of two cyprinodontid fishes. Can J Zool, 1991, 69: 530–533
32 Yamaguchi T, Yamaguchi S, Hirai T, et al. Follicle-stimulating hormone signaling and Foxl2 are involved in transcriptional regulation of aromatase gene during gonadal sex differentiation in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 359: 935–940
33 Sehgal G K, Saxena P K. Effect of estrone on sex composition, growth and flesh composition in common carp, *Cyprinus carpio* communis (Linn.). J Aquacult Trop, 1997, 12: 289–295
34 Piferrer F, Baker I J, Donaldson E M. Effects of natural, synthetic, aromatizable, and nonaromatizable androgens in inducing male sex differentiation in genotypic female chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). Gen Comp Endocrinol, 1993, 91: 59–65
35 Ito K, Mochida K, Fujii K. Molecular cloning of two estrogen receptors expressed in the testis of the Japanese common goby, *Acanthogobius flavimanus*. Zool Sci, 2007, 24: 986–996
36 Chaves-Pozo E, Liarte S, Vargas-Chacoff L, et al. 17Beta-estradiol triggers postspawning in spermatogenically active gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) males. Biol Reprod, 2007, 76: 142–148
37 Miura T, Higuchi M, Ozaki Y, et al. Progestin is an essential factor for the initiation of the meiosis in spermatogenetic cells of the eel. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103: 7333–7338
38 Liu X, Su H, Zhu P, et al. Molecular cloning, characterization and expression pattern of androgen receptor in *Spinibarbus denticulatus*. Gen Comp Endocrinol, 2009, 160: 93–101
39 Quinitio G F, Caberoy N B, Reyes Jr D M. Induction of sex change in female *Epinephelus coioides* by social control. Isr J Aquacult, 1997, 49: 77–83
40 Bhandari R K, Komuro H, Nakamura S, et al. Gonadal restructuring and correlative steroid hormone profiles during natural sex change in protogynous honeycomb grouper (*Epinephelus merra*). Zool Sci, 2003, 20: 1399–1404
41 Zhou L, Yao B, Xia W, et al. EST-based identification of genes expressed in the hypothalamus of male orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). Aquaculture, 2006, 256: 129–139
42 Alam M A, Kobayashi Y, Horiguchi R, et al. Molecular cloning and quantitative expression of sexually dimorphic markers Dmrt1 and Foxl2 during female-to-male sex change in *Epinephelus merra*. Gen Comp Endocrinol, 2008, 157: 75–85
43 Huang X, Guo Y, Shui Y, et al. Multiple alternative splicing and differential expression of *dmrt1* during gonad transformation of the rice field eel. Biol Reprod, 2005, 73: 1017–1024
44 Luo Y S, Hu W, Liu X C, et al. Molecular cloning and mRNA expression pattern of *Sox9* during sex reversal in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). Aquaculture, 2010, 306: 322–328
45 Kokokiris L, Fostier A, Athanassopoulou F, et al. Gonadal changes and blood sex steroids levels during natural sex inversion in the protogynous Mediterranean red porgy, *Pagrus pagrus* (Teleostei: Sparidae). Gen Comp Endocrinol, 2006, 149: 42–48
46 Chang C F, Lee M F, Chen G L. Estradiol-17β associated with the sex reversal in protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. J Exp Zool, 1994, 268: 53–58
47 Li G L, Liu X C, Lin H R. Effects of aromatizable and nonaromatizable androgens on the sex inversion of red-spotted grouper (*Epinephelus akaara*). Fish Physiol Biochem, 2006, 32: 25–33
48 Kojima Y, Bhandari R K, Kobayashi Y, et al. Sex change of adult initial-phase male wrasse, *Halichoeres trimaculatus* by estradiol-17 beta treatment. Gen Comp Endocrinol, 2008, 156: 628–632
49 Bhandari R K, Alam M A, Soyano K, et al. Induction of female-to-male sex change in the honeycomb grouper (*Epinephelus merra*) by 11-ketotestosterone treatments. Zool Sci, 2006, 23: 65–69
50 Li G L, Liu X C, Lin H R. Seasonal changes of serum sex steroids concentration and aromatase activity of gonad and brain in red-spotted grouper (*Epinephelus akaara*). Anim Reprod Sci, 2007, 99: 156–166
51 Wu C J, Chen R D, Ye Y Z, et al. Production of all-female carp and its applications in fish cultivation. Aquaculture, 1990, 85: 327
52 刘汉勤, 崔书勤, 侯昌春, 等. 从 XY 雌鱼雌核发育产生 YY 超雄黄颡鱼. 水生生物学报, 2007, 31: 718–725
53 Liu Z, Wu F, Jiao B, et al. Molecular cloning of doublesex and mab-3-related transcription factor 1, forkhead transcription factor gene 2, and two types of cytochrome P450 aromatase in Southern catfish and their possible roles in sex differentiation. J Endocrinol, 2007, 194: 223–241
54 Wang D S, Zhou L Y, Kobayashi T, et al. Doublesex- and Mab-3-related transcription factor-1 repression of aromatase transcription, a possible mechanism favoring the male pathway in tilapia. Endocrinology, 2010, 151: 1331–1340

55 Rodriguez-Mari A, Canestro C, Bremiller R A, et al. Sex reversal in zebrafish *fancl* mutants is caused by Tp53-mediated germ cell apoptosis. PLoS Genet, 2010, 6: e1001034

56 Slanchev K, Stebler J, de la Cueva-Mendez G, et al. Development without germ cells: The role of the germ line in zebrafish sex differentiation. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102: 4074–4079

57 Kurokawa H, Saito D, Nakamura S, et al. Germ cells are essential for sexual dimorphism in the medaka gonad. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104: 16958–16963

58 Li W S, Lin H R. The endocrine regulation network of growth hormone synthesis and secretion in fish: Emphasis on the signal integration in somatotropes. Sci China Life Sci, 2010, 53: 462–470

59 Hu W, Wang Y P, Zhu Z Y. Progress in the evaluation of transgenic fish for possible ecological risk and its containment strategies. Sci China Life Sci, 2007, 50: 573–579

60 Hu W, Zhu Z Y. Integration mechanisms of transgenes and population fitness of GH transgenic fish. Sci China Life Sci, 2010, 53: 401–408

61 Xu H Y, Li M Y, Gui J F, et al. Fish germ cells. Sci China Life Sci, 2010, 53: 435–446

62 Olsen L C, Aasland R, Fjose A. A *vasa*-like gene in zebrafish identifies putative primordial germ cells. Mech Dev, 1997, 66: 95–105

63 Kawakami Y, Saito T, Fujimoto T, et al. Visualization and motility of primordial germ cells using green fluorescent protein fused to 3′UTR of common carp *nanos*-related gene. Aquaculture, 2011, 317: 245–250

64 Raz E, Hopkins N. Primordial germ-cell development in zebrafish. Results Probl Cell Differ, 2002, 40: 166–179

65 Cao M X, Yang Y H, Xu H Y, et al. Germ cell specific expression of Vasa in rare minnow, *Gobiocypris rarus*. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2012, 162: 163–170

66 Shinomiya A, Tanaka M, Kobayashi T, et al. The *vasa*-like gene, *olvas*, identifies the migration path of primordial germ cells during embryonic body formation stage in the medaka, *Oryzias latipes*. Dev Growth Differ, 2000, 42: 317–326

67 Blaser H, Eisenbeiss S, Neumann M, et al. Transition from non-motile behaviour to directed migration during early PGC development in zebrafish. J Cell Sci, 2005, 118: 4027–4038

68 Raz E, Reichman-Fried M. Attraction rules: Germ cell migration in zebrafish. Curr Opin Genet Dev, 2006, 16: 355–359

69 Boldajipour B, Mahabaleshwar H, Kardash E, et al. Control of chemokine-guided cell migration by ligand sequestration. Cell, 2008, 132: 463–473

70 Herpin A, Fischer P, Liedtke D, et al. Sequential SDF1a and b-induced mobility guides medaka PGC migration. Dev Biol, 2008, 320: 319–327

71 Kunwar P S, Siekhaus D E, Lehmann R. *In vivo* migration: A germ cell perspective. Annu Rev Cell Dev Biol, 2006, 22: 237–265

72 Herpin A, Schindler D, Kraiss A, et al. Inhibition of primordial germ cell proliferation by the medaka male determining gene Dmrt1bY. BMC Dev Biol, 2007, 7: 99

73 Shiraishi E, Yoshinaga N, Miura T, et al. Mullerian inhibiting substance is required for germ cell proliferation during early gonadal differentiation in medaka (*Oryzias latipes*). Endocrinology, 2008, 149: 1813–1819

74 Houwing S, Kamminga L M, Berezikov E, et al. A role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in Zebrafish. Cell, 2007, 129: 69–82

75 Schulz R W, de França L R, Lareyre J J, et al. Spermatogenesis in fish. Gen Comp Endocrinol, 2010, 165: 390–411

76 Lubzens E, Young G, Bobe J, et al. Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. Gen Comp Endocrinol, 2010, 165: 367–389

77 Zohar Y, Munoz-Cueto J A, Elizur A, et al. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. Gen Comp Endocrinol, 2010, 165: 438–455

78 de Roux N, Genin E, Carel J C, et al. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100: 10972–10976

79 Tena-Sempere M, Felip A, Gomez A, et al. Comparative insights of the kisspeptin/kisspeptin receptor system: Lessons from non-mammalian vertebrates. Gen Comp Endocrinol, 2012, 175: 234–243

80 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. Endocrinology, 2004, 145: 3613–3618

81 Kitahashi T, Ogawa S, Parhar I. Cloning and expression of *kiss2* in the zebrafish and medaka. Endocrinology, 2009, 150: 821–831

82 Li S, Zhang Y, Liu Y, et al. Structural and functional multiplicity of the kisspeptin/GPR54 system in goldfish (*Carassius auratus*). J Endocrinol, 2009, 201: 407–418

83 Pasquier J, Lafont A G, Leprince J, et al. First evidence for a direct inhibitory effect of kisspeptins on LH expression in the eel, *Anguilla anguilla*. Gen Comp Endocrinol, 2011, 173: 216–225

84 Tsutsui K, Bentley G E, Ubuka T, et al. The general and comparative biology of gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH). Gen Comp Endocrinol, 2007, 153: 365–370

85 Zhang Y, Li S, Liu Y, et al. Structural diversity of the gnih/gnih receptor system in teleost: Its involvement in early development and the negative control of LH release. Peptides, 2010, 31: 1034–1043
86 Moussavi M, Wlasichuk M, Chang J P, et al. Seasonal effect of GnIH on gonadotrope functions in the pituitary of goldfish. Mol Cell Endocrinol, 2012, 350: 53–60
87 Trudeau V L. Neuroendocrine regulation of gonadotrophin II release and gonadal growth in the goldfish, *Carassius auratus*. Rev Reprod, 1997, 2: 55–68
88 Popesku J T, Martyniuk C J, Mennigen J, et al. The goldfish (*Carassius auratus*) as a model for neuroendocrine signaling. Mol Cell Endocrinol, 2008, 293: 43–56
89 Xu J, Huang W, Zhong C R, et al. Defining global gene expression changes of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in female sGnRH-antisense transgenic common carp (*Cyprinus carpio*). PLoS One, 2011, 6: e21057
90 Uzbekova S, Chyb J, Ferriere F, et al. Transgenic rainbow trout expressed sGnRH-antisense RNA under the control of sGnRH promoter of Atlantic salmon. J Mol Endocrinol, 2000, 25: 337–350
91 Maclean N, Hwang G, Molina A, et al. Reversibly-sterile fish via transgenesis. ISB News Report, 2003, 1–3
92 Hu W, Li S F, Tang B, et al. Antisense for gonadotropin-releasing hormone reduces gonadotropin synthesis and gonadal development in transgenic common carp (*Cyprinus carpio*). Aquaculture, 2007, 271: 498–506
93 Weidinger G, Stebler J, Slanchev K, et al. *dead end*, a novel vertebrate germ plasm component, is required for zebrafish primordial germ cell migration and survival. Curr Biol, 2003, 13: 1429–1434
94 Koprunner M, Thisse C, Thisse B, et al. A zebrafish *nanos*-related gene is essential for the development of primordial germ cells. Genes Dev, 2001, 15: 2877–2885
95 Ramasamy S, Wang H, Quach H N, et al. Zebrafish Staufen1 and Staufen2 are required for the survival and migration of primordial germ cells. Dev Biol, 2006, 292: 393–406
96 Hsu C C, Hou M F, Hong J R, et al. Inducible male infertility by targeted cell ablation in zebrafish testis. Mar Biotechnol, 2010, 12: 466–478
97 Hu S Y, Lin P Y, Liao C H, et al. Nitroreductase-mediated gonadal dysgenesis for infertility control of genetically modified zebrafish. Mar Biotechnol, 2010, 12: 569–578
98 Wakamatsu Y, Ju B, Pristyaznhyuk I, et al. Fertile and diploid nuclear transplants derived from embryonic cells of a small laboratory fish, medaka (*Oryzias latipes*). Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98: 1071–1076
99 Hu W, Wang Y P, Chen S P, et al. Nuclear transplantation in different strains of zebrafish. Chin Sci Bull, 2002, 47: 1277–1280
100 Lee K Y, Huang H, Ju B, et al. Cloned zebrafish by nuclear transfer from long-term-cultured cells. Nat Biotechnol, 2002, 20: 795–799
101 Liu T M, Liu L, Wei Q W, et al. Sperm nuclear transfer and transgenic production in the fish medaka. Int J Biol Sci, 2011, 7: 469–475
102 Luo D J, Hu W, Chen S P, et al. Identification of differentially expressed genes between cloned and zygote-developing zebrafish (*Danio rerio*) embryos at the dome stage using suppression subtractive hybridization. Biol Reprod, 2009, 80: 674–684
103 Luo D J, Hu W, Chen S P, et al. Critical developmental stages for the efficiency of somatic cell nuclear transfer in zebrafish. Int J Biol Sci, 2011, 7: 476–486
104 Takeuchi Y, Yoshizaki G, Takeuchi T. Generation of live fry from intraperitoneally transplanted primordial germ cells in rainbow trout. Biol Reprod, 2003, 69: 1142–1149
105 Saito T, Goto-Kazeto R, Arai K, et al. Xenogenesis in teleost fish through generation of germ-line chimeras by single primordial germ cell transplantation. Biol Reprod, 2008, 78: 159–166
106 Saito T, Goto-Kazeto R, Fujimoto T, et al. Inter-species transplantation and migration of primordial germ cells in cyprinid fish. Int J Dev Biol, 2010, 54: 1481–1486
107 Nobrega R H, Greebe C D, van de Kant H, et al. Spermatogonial stem cell niche and spermatogonial stem cell transplantation in zebrafish. PLoS One, 2010, 5: e12808
108 Majhi S K, Hattori R S, Yokota M, et al. Germ cell transplantation using sexually competent fish: An approach for rapid propagation of endangered and valuable germlines. PLoS One, 2009, 4: e6132
109 Okutsu T, Shikina S, Kanno M, et al. Production of trout offspring from triploid salmon parents. Science, 2007, 317: 1517
110 Lacerda S M, Batlouni S R, Costa G M. A new and fast technique to generate offspring after germ cells transplantation in adult fish: The Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. PLoS One, 2010, 5: e10740
111 Hong Y H, Winkler C, Schartl M. Pluripotency and differentiation of embryonic stem cell lines from the medakafish (*Oryzias latipes*). Mech Dev, 1996, 60: 33–44
112 Yi M S, Hong N, Li Z D, et al. Medaka fish stem cells and their applications. Sci China Life Sci, 2010, 53: 426–434

113 Chen S L, Sha Z X, Ye H Q, et al. Pluripotency and chimera competence of an embryonic stem cell line from the sea perch (*Lateolabrax japonicus*). Mar Biotechnol, 2007, 9: 82–91
114 Fan L C, Collodi P. Zebrafish embryonic stem cells. Methods Enzymol, 2006, 418: 64–77
115 Yi M S, Hong N, Hong Y H. Generation of medaka fish haploid embryonic stem cells. Science, 2009, 326: 430–433
116 Hong Y H, Liu T M, Zhao H B, et al. Establishment of a normal medakafish spermatogonial cell line capable of sperm production *in vitro*. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 8011–8016
117 Sakai N. *In vitro* male germ cell cultures of zebrafish. Methods, 2006, 39: 239–245
118 Fan L C, Moon J, Wong T T, et al. Zebrafish primordial germ cell cultures derived from *vasa: RFP* transgenic embryos. Stem Cells Dev, 2008, 17: 585–597
119 Shikina S, Yoshizaki G. Improved *in vitro* culture conditions to enhance the survival, mitotic activity, and transplantability of rainbow trout type A spermatogonia. Biol Reprod, 2010, 83: 268–276
120 Panda R P, Barman H K, Mohapatra C. Isolation of enriched carp spermatogonial stem cells from *Labeo rohita* testis for *in vitro* propagation. Theriogenology, 2011, 76: 241–251
121 Nakamura S, Kobayashi K, Nishimura T, et al. Identification of germline stem cells in the ovary of the teleost medaka. Science, 2010, 328: 1561–1563