

综 述

鲶类生殖内分泌学研究

STUDIES ON THE REPRODUCTIVE ENDOCRINOLOGY OF CATFISHES

王德寿 林浩然

(中山大学, 广州 510275)

Wang Deshou and Lin Haoran

(Zhongshan University, Guangzhou 510275)

关键词 鲶形目, 生殖内分泌学

KEYWORDS Siluriformes, Reproductive endocrinology

在世界淡、咸水主要养殖鱼类中, 鲶形目鱼类居第五位, 年产 25 万吨。近年来, 养殖鲶鱼的品种不断增加, 范围不断扩大, 还有许多有养殖潜力的新品种尚待开发。养殖鲶鱼的产量有大幅度上升的趋势。仅改革开放以来, 我国就先后从国外引进了革胡子鲶(非洲鲶鱼, *Clarias gariepinus*)、塘胡子鲶(亚洲鲶鱼, *C. batrachus*)、斑点胡子鲶(泰国鲶鱼, *C. macrocephalus*)、美洲的沟鲶(斑点叉尾鲟, *Ictalurus punctatus*)以及欧洲的多瑙河六须鲶(*Silurus glanis*)等优质高产的鲶鱼品种, 极大地推动了我国水产养殖业的发展。

在我国的淡水鱼类中, 鲶形目是仅次于鲤形目的第二大类群, 共有 100 多种和亚种, 其中不乏我国特产的极具经济价值的高档优质鱼类。在引进国外新品种的同时, 加强国产鲶鱼的调查研究, 充分利用国内潜在的种质资源, 显得尤为迫切。

国外不少学者在鲶类生殖内分泌学方面做了大量工作, 尤以荷兰学者对革胡子鲶的研究最为出色, 此外, 印度学者对印度鲶鱼(*Heteropneustes fossilis* Bloch)、美洲学者对沟鲶、亚洲学者对塘胡子鲶也做了不少研究。而国内鲶类生殖内分泌学的研究几乎是一片空白, 作者在阅读文献的过程中发现: 鲶形目生殖的神经内分泌调节和鲤形目基本相同, 但也有其种族特异性。

1 促性腺激素释放激素

下丘脑分泌的促性腺激素释放素(GnRH)对鲶鱼生殖系统的控制是非常重要的[De Leeuw等, 1985a, b; Richter等, 1987a; Goos等, 1987; Ngamvongchon等, 1988]。

离体研究从三个方面证实 LHRH 对革胡子鲶 GTH 释放的促进作用[De Leeuw等, 1986a]: (1) 垂体碎片的孵育培养; (2) 垂体细胞悬液的孵育培养; (3) 分离的促性腺激素分泌细胞的静态培养。在体注射 GnRH 及其类似物也能促进 GTH 释放并最终诱导卵子成熟和排卵[De Leeuw等, 1985b, 1988a]。垂体碎片灌流表明

Ca^{2+} 在 GnRH 促进 GTH 释放过程中起第二信使的作用[Van Asselt 等, 1989]。

细胞免疫化学研究表明, 革胡子鲶的 LHRH 免疫活性物质位于视前核(NPO)的核周体以及伸至近端远侧部(PPD, 即中腺垂体)邻近 GTH 分泌细胞的神经纤维内[Goos 等, 1985b]。而塘胡子鲶的 LHRH 免疫活性物质则位于 PPD、NPO、结节外侧核后部(NLTp)、视前垂体束(PHT)、视前围脑室核(NPP)、视交叉、端脑基部和中脑顶盖(MT)等广范区域内。尤为重要的是, 在嗅觉系统和视网膜中也检测到 LHRH 免疫活性物质。鲶鱼可通过 LHRH 的作用, 依据环境变化对生殖过程进行调节[Subhedar 和 Krishna, 1988], 这与金鱼的情况很相似。

Sherwood 等[1989]首次证实革胡子鲶具有两种 GnRH, 其中之一在脊椎动物中属首次发现。Ngamvongchon 等[1992]用反相高效液相色谱(HPLC)和放射免疫分析方法(RIA)从斑点胡子鲶的脑和垂体中分离纯化到两种 GnRH, GnRH-I 和 GnRH-II, 通过 Edman 降解法决定了它们的氨基酸顺序:

GnRH-I: PGlu-His-Trp-Ser-His-Gly-Leu-Asn-Pro-Gly-NH₂

GnRH-II: PGlu-His-Trp-Ser-His-Gly-Trp-Tyr-Pro-Gly-NH₂

鲶鱼 GnRH-II 与鸡的 GnRH-II 是一致的, 而 GnRH-I 是一种新发现的 GnRH。它在结构上的显著特征是第八位上独具天冬酰胺残基。鲶鱼 GnRH-I 与鲑鱼 GnRH 具有相似的生物学活性, 能够促进糖蛋白 GTH (GTH-II) 和生长激素(GH)的释放。Schulz 等[1993]在革胡子鲶脑的抽提物中也鉴定出上述两种 GnRH, 免疫组化分析证实, 它们均位于 GTH 细胞附近的肽能神经纤维内。GnRH-II 诱导 STM-II 释放的能力比 GnRH-I 高 1000 倍。另外, 与 GnRH-II 不同, GnRH-I 不能从垂体的 GnRH 受体上取代放射性碘标记的鲑鱼 GnRH。Bogerd 等[1994]对鲶鱼的这两种 GnRH 的 cDNA 进行了分离、特征分析和表达。

De Leeuw 等[1988a]证实革胡子鲶只有一种高亲和力的 GnRH 受体。这与金鱼明显不同, 金鱼垂体中有两种不同类型的受体, 一种是高亲和力、低容量的, 另一种是低亲和力高容量的。但这两种鱼的 GnRH 受体活性均有季节性变化, 并受到可芳化雄激素的反馈调节[Habibi 等, 1989]。

2 促性腺激素释放抑制因素

大量证据表明多巴胺(DA)是鲶鱼 GTH 释放的一种抑制因素(GRIF)[De Leeuw 等, 1986a; Goos 等, 1987]。Corio 等[1985]在革胡子鲶的腹中核(NVM)、后围脑室核(NPP)和侧结节核(NLT)两侧发现有 DA 免疫活性的神经元。HPLC 分析结合电化学观察也发现结节区的 DA 浓度较视前区和垂体高[Vermeulen, 1994]。免疫细胞化学研究还表明垂体内有 DA 免疫活性的神经纤维与 GTH 细胞接触, 进一步提供了 DA 参与 GTH 释放调节的证据[Peute 等, 1987]。DA 的激动剂阿朴吗啡(APO)对 GTH 释放有抑制作用而其抑制剂 Pimozide(PIM)有促进作用。垂体细胞灌流表明, 对革胡子鲶, DA 只能抑制 GnRH 刺激的 GTH 释放而不能抑制其自发的 GTH 释放, 这与金鱼的情况有所不同[De Leeuw 等, 1986a]。在体研究也证实单独使用 PIM 而不同时注射 LHRH 对幼鲶的 GTH 释放稍有作用, 而对成体则完全不起作用[De Leeuw 等, 1985a]。说明 DA 作为一种 GRIF 是通过阻断 GnRH 的作用实现的。放射受体分析表明, PIM 增强 GTH 释放的作用是通过增强 GnRH 受体对 GnRH 的亲合力实现的, 而 DA 既不能改变受体的亲合力, 也不能改变其结合容量, 它对 GTH 释放的抑制是通过减少 GnRH 受体的数量实现的[De Leeuw 等, 1988a, b]。DA 通过 D₂ 受体抑制 GnRH 刺激的 GTH 的释放[Van Asselt 等, 1988]。DA 的 D₂ 受体是一类高亲和力/低容量的结合位点[Van Asselt 等, 1990]。

3 促性腺激素分泌细胞

Peute 等[1984]对革胡子鲶脑垂体作电镜切片, 用双抗体免疫和免疫铁蛋白技术将两种嗜碱性细胞区别开来, 大的为促性腺激素(GTH)细胞, 小的为 TSH 细胞。从超微结构上看, GTH 细胞具有分泌颗粒, 分泌小球和高电子密度、有膜界的不规则团块(IM'S)。随着 GTH 细胞分泌活性的变化, 细胞内可见到膨大的不规则粗面内质网和数目不定的高尔基体。使用蛋白 A-金方法, 已从免疫细胞化学角度证实分泌颗粒, 分泌小球和 IM'S 中含有 GTH[Peute 等, 1984]。

Peute 等[1984; 1987]对革胡子鲶研究证实: GTH 分泌细胞受到具有 LHRH 免疫活性的 A 型神经纤维和具

有 DA 免疫活性的 B 型神经纤维的双重支配, B 型纤维和 GTH 细胞甚至有轴突联系。此外, 在 PPD 还观察到无免疫活性的 A 型和 B 型纤维, 说明还有其他神经调节的可能性。双重神经支配是硬骨鱼类脑垂体 GTH 分泌细胞的普遍特征, GTH 分泌细胞和腺垂体其他细胞类型的直接神经支配是许多硬骨鱼类脑垂体的独有特点。

4 促性腺激素

Goos 等[1986]采用伴刀豆球蛋白 A-琼脂糖凝胶亲和层析、在 Ultrogel Aca54 上过滤等方法, 从 2000 个革胡子鲈垂体中得到纯化的 GTH 制品, 建立了其 GTH-II 的放射免疫测定方法(RIA)。Bogerd 和 Goos[1993]分离了革胡子鲈 GTH-II 的 α - 和 β -亚基的 mRNA, 并对其进行了序列分析和体外表达。

在野生革胡子鲈, 整个繁殖期的 GTH 释放都是很少的, 只是在产卵前 GTH 才大量释放, 产卵后 GTH 细胞退化。在养殖条件下, 上述现象被抑制, 垂体储存大量 GTH, 但只是连续少量地释放出来, 仅可维持配子发生和类固醇合成, 但不能导致自发产卵。如果注射外源激素促使 GTH 大量释放, 就能成功地诱导排卵繁殖。可见, 生殖细胞的最后成熟和排卵是以垂体 GTH 的大量涌出为先导的。

印度学者 Sundararaj 和 Goswami[1966; 1969; 1974], Goswami 等[1985]通过大量研究发现, 注射羊 LH 诱导印度鲈鱼卵子成熟和排卵是以肾间组织和卵巢均产生类固醇为前提的, 即在卵子成熟过程中有一个 GTH-肾间组织-卵巢轴存在。

如前所述, GTH 的分泌受到 GnRH 的促进和 DA 的抑制, 同时, GTH 的分泌还受到性类固醇的反馈调节。在印度鲈鱼, 雄激素和雌激素能抑制 GTH 细胞的活性[Sundararaj 和 Goswami, 1966]。抗雌激素克罗米芬柠檬酸盐导致血浆 GTH 上升[Singh 和 Singh, 1976]。阉割雄性革胡子鲈导致血浆 GTH 水平上升, 垂体 GTH 含量下降, GTH 细胞去颗粒化。埋植可芳化的雄激素睾酮和雄烯二酮可消除阉割导致的血浆 GTH 水平上升, 并伴随着垂体 GTH 含量的恢复和 GTH 细胞的重新颗粒化, 而埋植不可芳化的雄激素却没有这种作用[De Leeuw 等, 1986b]。哺乳类雌激素通过儿茶酚胺实现负反馈调节。革胡子鲈性类固醇是通过多巴胺抑制 GTH 释放的, 其调节机制如下: 雄激素在芳化酶的作用下芳化为雌激素, 再在 2-羟化酶的作用下转化为儿茶酚雌激素, 最后经儿茶酚氧甲基转移酶 COMT 甲基化, 成为无活性的 2-甲氧雌激素。由于儿茶酚雌激素是 COMT 更好的底物, 当它存在时, DA 的甲基化(失活)便会减少。因此儿茶酚雌激素间接地促进了 GTH 的 DA 抑制, 从而实现类固醇的负反馈调节[Goos 等, 1985a; De Leeuw 等, 1987; Timmers 等, 1988]。De Leeuw 等[1985b]在革胡子鲈分离培养的 GTH 细胞中成功地证明有芳化酶、雌二醇 2-羟化酶和 COMT 活性。Timmers 等[1987、1988]也证实脑内有上述酶存在。进一步研究发现, 在精巢产生的 20 多种类固醇中, 只有睾酮才具有负反馈调节能力, 它起作用的部位在脑内的视前区[Vermeulen, 1994]。需要指出的是, 类固醇反馈调节 GTH 释放的机制可能存在种的特异性。在金鱼, 儿茶酚雌激素对 GTH 释放没有影响, 睾酮对 GTH 释放有正的调节作用; 在蟾胡子鲈, 雌二醇能够抑制单胺氧化酶的活性, 使 DA 水平上升, 从而减少垂体 GTH 释放[Manickam 和 Jou, 1989b]。

5 类固醇激素

通过对类固醇合成起关键作用的 3β -羟类固醇脱氢酶(3β -HSD)的组化研究发现, 鲈鱼卵巢中类固醇生成的主要部位是在膜细胞和颗粒细胞, 在间质细胞和排卵后滤泡中也有类固醇生成, 但在不同的鲈鱼, 类固醇生成的部位有所不同[Lambert 等, 1986; Upadhyaya 和 Haider, 1985; Rosenblum 等, 1987]。雄性鲈鱼类固醇合成的主要部位在精巢的间质细胞和小叶间细胞[Rosenblum 等, 1987; Van Den Hurk 等, 1987], 贮精囊也是雄性鲈鱼产生类固醇的重要器官, 贮精囊的间质细胞也有 3β -HSD 活性[Resink 等, 1987c]。此外, 肾间组织也具有合成多种类固醇的能力[Vermeulen, 1994]。

用氚标记的类固醇合成前体物质如孕烯醇酮和雄烯二酮与性腺一起孵育, 证明性腺和贮精囊具有合成多种 C_{21} 和 C_{19} 类固醇的能力[Lambert 等, 1986; Schoonen 和 Lambert, 1986a, b, 1987; Schooner 等, 1987a, b; Ver-

meulen, 1994]。性腺生成类固醇的能力和种类与性周期密切相关[Schoonen等, 1987b,c]。印度鲶鱼、革胡子鲶、*Ictalurus nebulosus* 和斑点叉尾鲟, 其雌鱼血浆雌二醇(E_2)的水平总是随着卵黄的积累而不断上升, 在产卵前达到高峰, 产卵后降至最低[Lamba等, 1983; Richter等, 1987; Rosenblum等, 1987; Mackenzie等, 1989]。在卵黄发生后, 伴随 E_2 的含量下降, 血浆睾酮的含量上升, 表现出产物与前体的关系[Lamba等, 1983; Schoonen等, 1987d], 也反映出此间芳化酶活性的降低。而在卵子的最后成熟阶段, $17\alpha-20\beta$ -二羟黄体酮的含量明显升高[Richter等, 1987]。注射雌激素可诱导鲶鱼产生卵黄蛋白原[Bradley和Grizzle, 1989]。鲶鱼类固醇水平的测定通常是通过RIA实现的, 目前, 气相色谱-质谱(GC-MS)分析已广泛地用于类固醇的种类鉴别和定量分析。

6 性外激素

革胡子鲶产后卵巢中类固醇葡萄糖苷酸的含量较产卵前明显升高[Schoonen等, 1987c]。Van Den Hurk等[1987]在排卵后的颗粒细胞中检测到 3β -HSD和尿苷二磷酸脱氢酶(UDPGD)活性。Resink等[1989a]将未排卵雌鱼与一尾雄鱼和一尾已经排卵的雌鱼放在同一水族箱中, 但用不透明的带孔隔板完全分开, 以阻断视觉联系, 能够成功地诱导雌鱼排卵, 用已排卵雌鱼的卵巢液取代排卵雌鱼, 也能诱导受试雌鱼排卵, 但是, 如果切断受试雌鱼的嗅束, 则完全没有排卵反应, 说明外激素是通过嗅觉传递的, 这也是首次证实雌鱼外激素与雄鱼外激素一起能诱导排卵反应。Van Weerd等[1991a]也报导, 无论用初次性成熟的雌鱼还是挤卵后再次恢复性腺发育的雌鱼, 接受来自雌雄混养的水的受试雌鱼比接受单性对照组的成熟系数GSI高, 阻断受试雌鱼嗅觉后, 这种现象消失。

雄性鲶鱼贮精囊除产生类固醇外, 也是产生性外激素最多的器官, 鲶鱼的贮精囊有季节性生长和退化现象, 酶组化分析表明革胡子鲶的精巢和贮精囊的间质细胞以及贮精囊的小管上皮细胞中均有 3β -HSD和UDPGD活性[Resink等, 1987c]。但是, 在繁殖期, 与贮精囊相比, 精巢产生类固醇葡萄糖苷酸的能力是微不足道的。Resink等[1987a]通过迷宫吸引实验发现: 刚排卵的革胡子鲶雌鱼被同种的雄鱼所吸引, 摘出雄鱼的贮精囊或剪断雌鱼的嗅神经, 这种现象消失, 摘除精巢后贮精囊补偿性肥大的雄鱼对雌鱼更有吸引力, 进一步说明贮精囊能产生性外激素释放到周围环境中, 通过嗅觉被雌鱼感知, 从而起到吸引异性, 产生生殖行为的作用。贮精囊的分泌液中含有多糖、蛋白质、磷脂、类固醇和类固醇葡萄糖苷酸, GC-MS分析显示其中的葡萄糖苷酸达八种之多, 若除去这些葡萄糖苷酸, 贮精囊分泌液便失去吸引排卵雌鱼的作用[Resink等, 1989b]。Schonen等[1986a, 1987b, 1988]用生化手段证实精巢和贮精囊都能产生类固醇和类固醇葡萄糖苷酸, 但在种类和数量上有明显差异。此外, 池塘养殖鲶鱼合成类固醇葡萄糖苷酸的种类和数量比野生鱼明显减少, 因而不能诱发生殖行为、实现自然繁殖。

Van Weerd等[1991b]报导, 完全阉割(摘除精巢和贮精囊)的雄鱼血浆中也有雄激素存在, 饲养雄鱼后的水, 不论雄鱼是否阉割, 均表现出有性外激素促进受试雌鱼卵巢发育的现象, 而饲养雌鱼的水没有这种作用。说明存在性腺以外的性外激素来源的可能性。事实上, Ali等[1987]已经证实, 类固醇葡萄糖苷酸能够在革胡子鲶的上皮细胞中形成。

7 激素诱导鲶鱼排卵和产卵

降雨后水位上升, 淹没鲶鱼生活水体边缘的低洼草地, 水变混浊, 是诱发鲶鱼生殖行为、实现自然产卵的重要诱因。缺乏这些环境变化, 如在实验或养殖条件下, 鲶鱼便不能自然繁殖, 卵巢停留在卵黄发生完成阶段。大量研究表明野生鲶鱼和养殖鲶鱼的GTH分泌、类固醇合成和性外激素的合成释放均表现出极大的差异(前已述及)。但是, 通过注射外源激素能够诱导鲶鱼排卵。

在革胡子鲶, Eding等[1982]分别注射2.5和4 IU HCG/g体重, 都成功地诱导了排卵。De Leeuw等[1985a]用5mg PIM + 0.05mg LHRHa/Kg体重作一次性注射, 获得100%的排卵率, 且绝大多数卵子挤出后能正常受精发育。注射 17α -羟基孕酮[Richter等, 1985], 甚至直接注射GTH或鲤鱼垂体匀浆也能诱导卵子成熟和排卵。De Leeuw等[1988a]比较了GnRH及其类似物SGnRHa(D-Arg⁶-Pro⁹-sGnRH-Net)、Buserelin[D-Ser(t-

Bu)⁶-Pro⁹-LHRH-Net]和 LHRH₂(D-Ala⁶-Pro⁹-LHRH-Net)的亲力和生物学活性,结果发现 sGnRHa 和 Buserelin 具有相似的促 GTH 释放活性,且高于 sGnRH 和 LHRHa, sGnRH 的活性最低。上述几种类似物的相对亲和力的顺序为: sGnRHa > Buserelin > LHRHa > sGnRH。sGnRHa 和 Buserelin 是最稳定的 GnRH 类似物。这些结果表明 GnRH 多肽的降解速率是决定其生物学活性的主要因素。Steyn 和 Van Vuren[1987]将新鲜精液、液氮保存 14 天和 16 个月的精液与同一尾雌鱼的成熟卵子受精,发现前两种情况下有 51% 的卵子孵出,而液氮保存 16 个月的精液,仍可得到 41% 的孵化率。可见,在生产上用液氮保存精液,进行人工受精是完全可行的。

Zonneveld 等[1988]用鲤垂体悬浊液(CP)注射蟾胡子鲶,以 6 和 9mg CP/kg 体重的剂量,17 小时后挤卵受精效果最佳。单独注射 LHRHa 或 PIM,不能诱导蟾胡子鲶排卵,但将 0.05μg LHRHa + 5μg PIM/g 体重结合注射则产生很高(85.7%)的排卵率[Manickam 和 Joy,1989a]。

HCG 也能诱导斑点胡子鲶排卵,一次性注射 LHRHa 20μg/kg 体重也能在 16 ~ 18 小时内诱导其排卵[Ngamvongchon 等,1988]。

国内学者多以 HCG 或 LHRHa 与鲤或白鲢垂体悬液结合注射的方法诱导鲶形目鱼类排卵,尽管也有一些成功的报导,但远远不能满足鲶养殖发展的需要,加强国产鲶类的生殖内分泌调节机理和激素诱导排卵的系统研究,必将对我国鲶类养殖业的发展产生巨大的影响。

参 考 文 献

- [1] Ali, S. A. *et al.*, 1987. The skin of the male African catfish, *Clarias gariepinus*: a source of steroid Glucuronides. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **66**:415 ~ 424.
- [2] Bogerd, J. and H. J. Th. Goos, 1993. Isolation, sequence analysis and expression of mRNAs encoding Gth II α- and β- subunits of the African catfish. Program summary of XII international congress of comparative endocrinology. Toronto, Ontario, Canada.
- [3] Bogerd, J. *et al.*, 1994. Isolation, characterization and expression of cDNAs encoding the catfish-type and chicken-type gonadotropin-releasing hormone precursors in the African catfish. *Eur. J. Biochem.* **222**(2):541 ~ 543.
- [4] Bradley, J. T. and J. M. Grizzle, 1969. Vitellogenin induction by estradiol in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **73**:23 ~ 39.
- [5] Corio, M. *et al.*, 1985. Immunoreactive dopaminergic neurons in the hypothalamus of a fish, *Clarias lazera*, and an amphibian, *Xenopus laevis*. *Neurosci. Lett. Suppl.*, **22**:110.
- [6] De Leeuw, R. *et al.*, 1985a. Pimzide-LHRHa-induced breeding of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell). *Aquaculture*, **44**:295 ~ 302.
- [7] De Leeuw, R. *et al.*, 1985b. Aromatase, estrogen 2-hydroxylase, and catechol-O-methyltransferase activity in isolated, cultured gonadotropic cells of mature African catfish. *Clarias gariepinus* (Burchell). *Gen. Comp. Endocrinol.*, **60**:171 ~ 177.
- [8] De Leeuw, R. *et al.*, 1986a. The dopaminergic inhibition of the gonadotropin-releasing hormone-induced gonadotropin release: an in vitro study with fragments and cell suspensions from pituitaries of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell). *Gen. Comp. Endocrinol.*, **63**:171 ~ 177.
- [9] De Leeuw, R. *et al.*, 1986b. The effect of aromatizable androgens, non-aromatizable androgens, and estrogens on gonadotropin release in castrated African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell): a physiological and ultrastructural study. *Cell Tissue Res.*, **243**:587 ~ 594.
- [10] De Leeuw, R. *et al.*, 1987. The regulation of gonadotropin release by neurohormones and gonadal steroids in the African catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquaculture*, **63**:43 ~ 58.
- [11] De Leeuw, R. *et al.*, 1988a. Binding affinity and biological activity of gonadotropin-releasing hormone analogs in the African catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquaculture*, **71**:119 ~ 131.
- [12] De Leeuw, R. *et al.*, 1988b. The dopaminergic regulation of gonadotropin-releasing hormone receptor binding in the pituitary of the African catfish, *Clarias gariepinus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **72**:408 ~ 415.
- [13] Eding, E. M. *et al.*, 1982. Effects of human chorionic gonadotropin (HCG) on maturation and ovulation of oocytes in the ovary of the African catfish *Clarias lazera*. In: C. J. J. Richer and H. J. Th. Goos (Editors), Proc. Int. Symp. Reprod. Physiol.

- Fish, Wageningen, The Netherlands, 2~6 August 1982, PUDOC, Wageningen, P. 195.
- [14] Goos, H. J. Th. *et al.*, 1985a. Steroid aromatase, 2-hydroxylase and COMT activity in gonadotropic cells of the African catfish, *Clarias gariepinus*. *Cell Biol. Int. Rep.*, **9**:529.
- [15] Goos, H. J. Th. *et al.*, 1985b. Gonadotropin-releasing hormone-immunoreactive neuronal structures in the brain and pituitary of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell). *Cell Tissue Res.* **241**:593~596.
- [16] Goos, H. J. Th. *et al.*, 1986. Purification of gonadotropin hormone from the pituitary of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell), and the development of a homologous radioimmunoassay. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **63**:162~170.
- [17] Goos, H. J. Th. *et al.*, 1987. The effect of luteinizing hormone-releasing hormone analogue (LHRHa) in combination with different drugs with anti-dopamine and anti-serotonin properties on gonadotropin release and ovulation in the African catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquaculture*, **63**:143~156.
- [18] Goswami, S. V. *et al.*, 1985. Gonadotropin-induced oocyte maturation in the catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch), requires steroidogenesis in both interrenal and ovary. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **57**:53~63.
- [19] Habibi, H. R. *et al.*, 1989. Pituitary gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor activity in goldfish and catfish: seasonal and gonadal effects. *Fish Physiology and Biochemistry*, **7**:109~118.
- [20] Lamba, V. J. *et al.*, 1983. Circannual and circadian variations in plasma levels of steroids (cortisol, estradiol-17 β , estrone, and testosterone) correlated with the annual gonadal cycle in the *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Gen. Comp. Endocrinol.*, **50**:205~225.
- [21] Lambert, J. G. D. *et al.*, 1986. Gonadal steroidogenesis and the possible role of steroid glucuronids as sex pheromones in two species of teleosts. *Fish Physiol. Biochem.* **2**:101~107.
- [22] Mackenzie, D. S. *et al.*, 1989. Seasonal changes in the thyroid and reproductive steroid hormones in female channel catfish *Ictalurus punctatus* in pond culture. *Aquaculture*, **78**:63~80.
- [23] Manickam, P. and K. P. Joy, 1989a. Induction of maturation and ovulation by pimozone-LHRH analogue treatment and resulting high quality egg production in the Asian catfish, *Clarias batrachus* (L.). *Aquaculture*, **83**:193~199.
- [24] Manickam, P. and K. P. Joy, 1989b. Changes in hypothalamic monoamine oxidase activity in relation to season, ovariectomy, and 17 β -estradiol administration in intact and ovariectomized catfish, *Clarias batrachus* (L.). *Gen. Comp. Endocrinol.* **75**:437~445.
- [25] Ngamvongchon, S. *et al.*, 1988. Effectiveness of an LHRH analogue for the induced spawning of carp and catfish in northeast Thailand. *Aquaculture*, **74**:35~40.
- [26] Ngamvongchon, S. *et al.*, 1992. Primary structures of two forms of gonadotropin-releasing hormone, One distinct and one conserved, from catfish brain. *Molecular cellular neuroscience*, **3**:17~22.
- [27] Peute, J. *et al.*, 1984. Ultrastructure and immunolabelling of gonadotropins and thyrotropins in the pituitary of the African catfish, *Clarias lazera*. *Cell Tissue Res.*, **239**:95~108.
- [28] Peute, J. *et al.*, 1987. Immunocytochemical evidence for peptidergic (GnHR) and dopaminergic innervation of the gonadotropic cells in the pituitary of the African catfish, *Clarias gariepinus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **67**:303~310.
- [29] Resink, J. W. *et al.*, 1987a. The seminal vesicle as source of sex attracting substances in the African catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquaculture*, **63**:115~127.
- [30] Resink, J. W. *et al.*, 1987b. Seasonal changes in steroid metabolism in the male reproductive organ system of the African catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquaculture*, **63**:59~76.
- [31] Resink, J. W. *et al.*, 1987c. Quantitative enzyme histochemistry of steroid and glucuronide synthesis in testes and seminal vesicle, and its correlation to plasma gonadotropin level in *Clarias gariepinus*. *Aquaculture*, **63**:97~114.
- [32] Resink, J. W. *et al.*, 1989a. Induction of gonadotropin release and ovulation by pheromones in the African catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquaculture*, **83**:167~177.
- [33] Resink, J. W. *et al.*, 1987b. The chemical nature of sex attracting pheromones from the seminal vesicle of the African catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquaculture*, **83**:137~151.
- [34] Richter, C. J. J. *et al.*, 1985. 17 α -Hydroxyprogesterone-induced breeding of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell), without priming with gonadotropin. *Aquaculture*, **44**:285~293.

- [35] Richter, C. J. J. *et al.*, 1987. The effect of pimoziide-LHRHa and 17 α -hydroxyprogesterone on plasma steroid levels and ovulation in the African catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquaculture*, **63**:1575 ~ 168.
- [36] Rosenblum, P. M. *et al.*, 1987. Gonadal morphology, enzyme histochemistry and plasma steroid levels during the annual reproductive cycle of male and female brown bullhead catfish, *Ictalurus nebulosus* Lesueur. *J. Fish Biol.*, **31**:325 ~ 341.
- [37] Schoonen, W. G. E. J. and J. G. D. Lambert, 1986a. Steroid metabolism in the testes of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell), during the spawning season, under natural conditions and kept in ponds. *Gen. Comp. Endocrinol.* **61**:40 ~ 52.
- [38] Schoonen, W. G. E. J. and J. G. D. Lambert, 1986b. Steroid metabolism in the seminal vesicle of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell), during the spawning season, under natural conditions and kept in ponds. *Gen. Comp. Endocrinol.* **61**:355 ~ 367.
- [39] Schoonen, W. G. E. J. and J. G. D. Lambert, 1987. Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of steroids and steroid glucuronides in the seminal vesicle fluid of African catfish, *Clarias gariepinus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **68**:375 ~ 386.
- [40] Schoonen, W. G. E. J. *et al.*, 1987a. Steroidogenesis in the testes and seminal vesicles of spawning and non-spawning African catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquaculture*, **63**:77 ~ 88.
- [41] Schoonen, W. G. E. J. *et al.*, 1987b. A quantitative study of steroid conversion in the testes of African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell), under natural spawning and natural and culture non-spawning conditions. *J. Endocrinol.*, **112**:323 ~ 332.
- [42] Schoonen, W. G. E. J. *et al.*, 1987c. Steroidogenesis in pre- and post-spawned ovaries of African catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquaculture*, **63**:129 ~ 142.
- [43] Schoonen, W. G. E. J. *et al.*, 1988. Quantitative analysis of steroids and steroid glucuronides in the seminal vesicle fluid of feral spawning and cultivated non-spawning African catfish, *Clarias gariepinus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **70**:91 ~ 100.
- [44] Schulz, R. W. *et al.*, 1993. Two gonadotropin releasing hormones in the African catfish. Program summary of XII international congress of comparative endocrinology. Toronto, Ontario, Canada.
- [45] Sherwood, N. M. *et al.*, 1989. A new member of the gonadotropin-releasing hormone family in teleosts: catfish gonadotropin-releasing hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **75**:427 ~ 436.
- [46] Singh, A. K. and T. P. Singh, 1976. Effect of clomid, sexovid and prostaglandins on induction of ovulation and gonadotropin secretion in a freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Endokrinologie* **68**:129 ~ 136.
- [47] Steyn, G. J. and J. H. J. Van Vuren, 1987. The fertilizing capacity of cryopreserved sharptooth catfish (*Clarias gariepinus*) sperm. *Aquaculture*, **63**:187 ~ 193.
- [48] Subhedar, N. and N. S. R. Krishna 1988. Immunocytochemical localization of LH-RH in the brain and pituitary of the catfish, *Clarias batrachus* (Linn.). *Gen. Comp. Endocrinol.*, **72**:431 ~ 442.
- [49] Sundararaj, B. I. and S. V. Goswami, 1966. Effects of metopiron (SU-4885) on luteinizing hormone and corticosteroid - induced ovulation and spawning in hypophysectomized catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *J. Exp. Biol.*, **163**:49 ~ 54.
- [50] Sundararaj, B. I. and S. V. Goswami, 1969. Role of interrenal in luteinizing hormone-induced ovulation and spawning in the catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch.). *Gen. Comp. Endocrinol. Suppl.* **2**:374 ~ 384.
- [51] Sundararaj, B. I. & S. V. Goswami, 1974. Effects of ovine luteinizing hormone and porcine adrenocorticotropin on maturation of oocytes of the catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). in ovary-interrenal coculture. *Gen. Comp. Endocrinol.* **23**:276 ~ 281.
- [52] Timmers, R. J. M. *et al.*, 1987. Localization of aromatase in the brain of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell), by microdissection and biochemical identification. *J. Comp. Neurol.* **258**:368 ~ 377.
- [53] Timmers, R. J. M. *et al.*, 1988. Estrogen-2-hydroxylase in the brain of the male African catfish, *Clarias gariepinus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **72**:190 ~ 203.
- [54] Upadhyaya, N. and S. Haider, 1985. Ovarian cycle of a freshwater catfish, *Mystus vittatus* (Bloch.) with a special note on the steroidogenic sites. *Z. mikrosk.-anat. Forsch., Leipzig*, **99**:5, 845 ~ 854.
- [55] Van Asselt, L. A. C. *et al.*, 1988. Evidence for the involvement of D2 receptors in the dopaminergic inhibition of gonadotropin release in the African catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquaculture*. **72**:369 ~ 378.
- [56] Van Asselt, L. A. C. *et al.*, 1989. Role of calcium ions in action of gonadotropin-releasing hormone on gonadotropin secretion in the African catfish, *Clarias gariepinus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **76**:46 ~ 52.
- [57] Van Asselt, L. A. C. *et al.*, 1990. Characterization of dopamine D2 receptor in the pituitary of African catfish, *Clarias gariepi-*

nus. Gen. Comp. Endocrinol., **80**:107 ~ 115.

- [58] Van Den Hurk, R. *et al.*, 1987. An enzyme histochemical study concerning the localization of steroid glucuronide production in the reproductive organs of the African catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquaculture*. **63**:89 ~ 96.
- [59] Van Weerd, J. H. *et al.*, 1991a. Male-induced shifts in pattern of vitellogenesis during puberty and recrudescence of female African catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquaculture*. **94**:99 ~ 120.
- [60] Van Weerd, J. H. *et al.*, 1991b. Plasma androgen levels in castrated adult male African catfish, *Clarias gariepinus*, in relation to pheromonal stimulation of ovarian growth in pubertal conspecifics. *Aquaculture*. **97**:97 ~ 107.
- [61] Vermeulen, G. J., 1994. Testicular steroids and catecholamines in the brain of the African catfish, *Clarias gariepinus*. in relation to gonadotropin release. Thesis. Univ. Utrecht, The Netherlands. 119pp.
- [62] Zonneveld, N. *et al.*, 1988. Induced spawning and egg incubation of the Asian catfish, *Clarias batrachus*. *Aquaculture*. **74**:41 ~ 47.