

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2012.00045

去眼柄后中华绒螯蟹法呢酸甲基转移酶表达和卵巢发育

郭敏¹, 魏华^{1,2}, 陶贤继¹, 吴婷婷¹

1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306;

2. 上海农林职业技术学院, 上海 201600

摘要: 为了解甲基法呢酯(methyl farnesoate, MF)在中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)卵巢发育中的调控作用, 采用离体方法研究了中华绒螯蟹大颚器(mandibular organ, MO)以及 X-器官窦腺复合体(X-organ-sinus gland, XO-SG)对卵巢发育的作用。将 MO 与离体卵母细胞共培养作为实验组 1, 将 MO 和 XO-SG 与离体卵母细胞共培养作为实验组 2, 仅添加培养液的卵母细胞作为对照组。实验发现, 蟹去眼柄(eyestalk ablation, ESA)后的第 1、3、6、14 天, 同对照组相比, MO 对其卵母细胞的发育均有极显著促进作用。ESA 处理第 6 天, MO 对卵母细胞发育的促进作用最强。XO-SG 能逆转 ESA 处理后 MO 对卵巢发育的促进作用($P < 0.01$)。荧光定量 PCR 技术检测结果显示, ESA 处理后, MO 中法呢酸甲基转移酶(farnesoic acid O-methyltransferase, *FAMeT*)mRNA 相对表达量上升。同未去眼柄的对照组相比, 第 1、3 天 *FAMeT* mRNA 表达丰度无明显变化($P > 0.05$), 第 6、14 天表达丰度提高至 265%左右($P < 0.01$)。结果表明, 中华绒螯蟹 MO 功能性物质能够促进卵母细胞发育, 且 ESA 处理后第 6 天 MO 生物效应最强。MO 中 *FAMeT* mRNA 的合成受 XO-SG 的抑制调节。在离体条件下, 中华绒螯蟹 XO-SG 能够抑制卵母细胞的发育。

关键词: 中华绒螯蟹; 法呢酸甲基转移酶; 大颚器; 卵巢发育; 组织培养; 去眼柄

中图分类号: S94

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2012)01-0045-06

甲基法呢酯(methyl farnesoate, MF)是由甲壳动物大颚器(mandibular organ, MO)合成和分泌的一种半萜类激素, 是无脊椎动物的促性腺激素, 能促进甲壳动物卵母细胞发育成熟^[1-3], 并且与甲壳动物蜕皮、渗透压调节等多种生理活动密切相关^[4-9]。MF 合成的过程中有多种酶的参与, 法呢酸甲基转移酶(farnesoic acid O-methyltransferase, *FAMeT*)是 MO 合成 MF 途径中最后一步的限速酶, 能够催化法呢酸发生甲基化反应生成 MF^[10], 可作为性腺成熟的标志物^[11-13]。

甲壳动物眼柄的 X-器官窦腺复合体(X-organ-sinus gland, XO-SG)是控制性腺成熟的重要部位, 其主要功能是合成和分泌高血糖激素(crustacean

hyperglycemic hormone, CHH)家族, 该家族包括性腺抑制激素(gonad-inhibiting hormone, GIH)、蜕皮抑制激素(molt-inhibiting hormone, MIH)、高血糖激素(CHH)以及大颚器抑制激素(mandibular-organ-inhibiting hormone, MOIH)^[14]。这些激素可抑制 MO 合成和释放 MF, 从而抑制性成熟。当甲壳动物性成熟时 GIH 和 MOIH 下降, 或去眼柄(eyestalk ablation, ESA)后解除了 GIH 和 MOIH 的抑制作用, 都可导致性腺的成熟发育。这个过程也可能通过 *FAMeT* 的活性增强、增加甲基法呢酯的含量而实现^[15-16]。因此阐明 *FAMeT* 活性增加与性腺发育之间的关系是甲壳动物性腺发育调控的重要研究内容。

收稿日期: 2011-05-16; 修订日期: 2011-09-19.

基金项目: 上海市水生生物重点学科建设项目(S30701); 上海市现代农业产业技术体系建设(中华绒螯蟹, D-8003-10-0208); 上海高校创新团队项目(第二期).

作者简介: 郭敏(1987-), 女, 硕士研究生, 从事水生动物营养繁殖学研究. E-mail: guomin_675@163.com

通信作者: 魏华, 教授, 从事鱼类和甲壳类生殖生理学研究. Tel: 021-57823508. E-mail: weih@shafc.edu.cn

本研究主要探讨 ESA 处理后中华绒螯蟹 MO 中 *FAMeT* mRNA 表达的变化和 ESA 处理后 MO 对卵母细胞生长的作用, 从 *FAMeT* mRNA 的表达量增加和卵母细胞生长两个角度探讨 *FAMeT* mRNA 的表达在促进卵母细胞发育中的作用, 阐明 *FAMeT* mRNA 的表达量与卵母细胞成熟的相关性, 丰富中华绒螯蟹生殖生理的基本内容。

1 材料和方法

1.1 实验材料

10 月份于上海崇明养殖场采集中华绒螯蟹, 运回上海海洋大学暂养在水族箱 1 周, 水温控制在 22℃ 左右。去眼柄时用酒精灯灼烧镊子至发红, 迅速烫伤眼柄基部, 为防止感染, 在伤口处用青霉素和链霉素混合液擦拭^[17]。将两侧眼柄去除后, 每天 18:00 投喂 1 次, 每 2 天排污 1 次。对照组不去眼柄。分别在去眼柄后第 0、1、3、6、14 天挑选附肢整齐、规格基本一致的个体各 3 只作为实验蟹。实验前记录每只蟹的体质量、体长等常规生物学指标。迅速解剖中华绒螯蟹, 立即采集 MO, 液氮速冻, -80℃ 保存。用于组织的总 RNA 提取。

1.2 试剂与仪器

氯仿(分析纯)、异丙醇(分析纯)、高锰酸钾、酒精购于国药集团化学试剂有限公司; TRIZOL 试剂、DEPC 购于上海生工生物工程技术服务有限公司; PrimeScript® RT reagent Kit With gDNA Eraser 试剂盒和 SYBR® Premix Ex Taq™ 试剂盒, 购于大连 TaKaRa 生物公司; 荧光定量 PCR 引物由上海英俊生物技术有限公司合成; 新生牛血清、青链霉素、M199 液体培养基(Thermo)购于英俊生物技术有限公司; 12 孔板购于上海百赛生物公司; Sigma 冷冻离心机; CYY-6C 电泳仪; Gene Genius 凝胶成像系统; Bio-Rad iQ5 荧光定量 PCR 仪; Thermo 6600 二氧化碳培养箱; Motica-AE21 倒置显微镜。

1.3 卵巢组织培养及分组

1.3.1 卵巢组织培养 选取 ESA 处理不同天数的中华绒螯蟹, 将蟹置于 0.01% 的高锰酸钾溶液中浸泡 30 min, 用蒸馏水清洗干净, 酒精擦拭消毒。在无菌的操作环境中, 取出卵巢组织置于配

置好的蟹生理缓冲液(NaCl 28.986 g + KCl 0.709 7 g + CaCl₂ 1.798 g + MgCl₂ 0.1708g + MgSO₄ 3.155 g + NaHCO₃ 0.499 8 g + HEPE 4.766 2 g + 蒸馏水 1 L, pH 值为 7.2)。用镊子分离卵母细胞, 漂洗 2 次, 倒入培养基洗 2 次, 置入 12 孔板。每孔加入 2 mL M199 培养液(内含 10% 小牛血清, 10 U/mL 青霉素 10 μg/mL 链霉素, 0.22 μm 微孔滤膜过滤)。剪下带几丁质腱的大颚, 置入 4℃ 的蟹生理缓冲液中, 在解剖镜下分离出 MO。并且从未去眼柄的中华绒螯蟹眼柄中解剖出 XO-SG。

1.3.2 实验分组 将剥离的卵母细胞平均培养在 9 个培养皿中: 实验组 1 共 4 个培养皿, 分别加入 ESA 处理后 1、3、6、14 d 的 MO 培养离体卵母细胞; 实验组 2 共 4 个培养皿, 分别加入 ESA 处理 1、3、6、14 d 的 MO 和正常的 XO-SG 各 1 个, 共同培养离体卵母细胞。对照组 1 个培养皿, 仅添加 M199 培养液培养卵母细胞。实验组和对照组的卵巢组织取自同一个卵巢。置于 CO₂ 培养箱中, 24 h 后置于倒置显微下观察卵母细胞生长情况。

1.4 RNA 提取以及浓度、纯度和完整性鉴定

采用 TRIZOL 试剂抽提 MO 组织的总 RNA, 测量所得 RNA 的 OD_{260nm}/OD_{280nm} 值均在 1.8 ~ 2.0 之间, 说明 RNA 无 DNA 和蛋白污染, 纯度高。通过 1%TAE 琼脂糖凝胶电泳检测, 28S、18S 带清晰, 说明 RNA 的完整性好。

1.5 mRNA 实时荧光定量 PCR 引物的设计与合成

根据已经报道的中华绒螯蟹 18S rRNA 基因全序列(GenBank 序列号: GU362670)以及 *FAMeT* 基因全序列(GenBank 序列号: GQ861517)设计引物。所得 18S rRNA 上游引物序列: CTCAACACGG GGAACCTCA, 下游引物: CAGACATATCGCTCC ACCAA, 扩增片段碱基数为 119 bp; *FAMeT* 上游引物序列: GCGGACACCTTCAACTTCAGC, 下游引物序列: GTCACCCTTGATCAGACGG ATG, 扩增片段碱基数为 147 bp。引物合成委托上海英俊生物技术有限公司合成。引物使用 ddH₂O 稀释至 10 μmol/L。

1.6 mRNA 实时荧光定量 PCR

以 500 ng 总 RNA 作为模板, 按照 PrimeScript® RT reagent Kit With gDNA Eraser 试剂盒说明说进

行逆转录, 得到 cDNA。荧光定量 PCR 25 μ L 反应体系: SYBR® Premix Ex Taq™ 12.5 μ L, PCR Forward Primer 0.5 μ L, PCR Reverse Primer 0.5 μ L, cDNA 模板 2 μ L, dH₂O 9.5 μ L。每个样品做 3 管平行试验。反应程序为: 95℃ 预变性 30 s; 95℃ 变性 5 s, 60℃ 退火和延伸 25 s, 循环次数为 40。具体操作步骤见 Bio-Rad iQ5 荧光定量 PCR 仪使用说明书。

1.7 卵母细胞测定

所有的卵巢组织学测量数据均取自于同批卵巢的卵母细胞, 在倒置显微镜下随机选取 20 个生长较好的卵母细胞, 用 MOTIC 软件测量卵母细胞直径以及滤泡细胞厚度, 实验数据统计分析采用 SPSS16.0 软件处理, 单因素方差分析(One-way ANOVA), 记录数据为平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm SD$)。

1.8 FAMeT 表达量分析

样品设置相同的阈值, 以 18S rRNA 为内参, 对得到的 C_t 值进行均一化处理。采用 2^{- Δ C_t} 方法确定分析目的基因相对表达丰度。实验数据统计分析采用 SPSS16.0 软件处理, 单因素方差分析(One-way ANOVA)。FAMeT 基因表达量用平均值 $\pm$ 标准误($\bar{x} \pm SE$)表示。

2 结果与分析

2.1 ESA 处理后不同天数的大颚器对卵母细胞大小的影响

中华绒螯蟹卵巢呈紫褐色, 卵粒肉眼明显可见。倒置显微镜下观察到, 卵母细胞被滤膜细胞包裹形成滤泡。实验结果如表 1 所示, 实验组 1 中分别用 ESA 处理 1、3、6、14 d 的 MO 培养离体中华绒螯蟹卵母细胞。培养后 24 h, 同对照组

相比, ESA 处理不同天数的 MO 均能极显著促进中华绒螯蟹卵母细胞发育($P < 0.01$); ESA 处理第 6 天 MO 的促进作用最强, 卵母细胞直径达 (415.39 $\pm$ 15.01) μ m, 比对照组 (335.63 $\pm$ 24.43) μ m 约增加 23.76%; ESA 处理第 14 天的 MO 对卵母细胞发育的促进作用较第 6 天极显著减弱($P < 0.01$)。实验组 2 中分别加入 XO-SG 和 ESA 处理后不同天数的 MO 培养卵母细胞, 培养后 24 h, 同对照组相比, 该组第 1、3 天的 MO 对卵母细胞没有显著影响($P > 0.05$); ESA 处理第 6、14 天的 MO 使卵母细胞直径极显著增加($P < 0.01$), 但比实验组 1 相同天数的卵母细胞直径增加幅度小($P < 0.05$)。第 1、3 天实验组 2 的卵母细胞的直径要比实验组 1 对应天数的卵母细胞直径极显著减小($P < 0.01$)。

2.2 RNA 电泳检测

用紫外分光光度计测量提取的总 RNA OD_{260nm}/OD_{280nm} 值, 实验结果表明, 所提总 RNA 的 OD 在 1.8~2.0 之间。取 3 μ L 的总 RNA 与 2 μ L 溴酚蓝缓冲液混合, 通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 28S、18S 带完整, 样品 RNA 纯度和完整性均符合要求。

2.3 去眼柄对大颚器 FAMeT 基因表达的影响

2.3.1 标准曲线和熔解曲线分析 在不同的稀释倍数下 FAMeT 和 18SrRNA 基因扩增效率分别为 103.5% 和 108.5%。标准曲线的相关系数分别为 0.994 和 0.999。扩增效率以及相关系数均满足实时定量荧光 PCR 的要求。

对熔解峰图和熔解曲线图分析得出, FAMeT 基因和 18S rRNA 基因的熔解曲线呈单一峰, 无引物二聚体和非特异性扩增。说明两个基因的引

表 1 ESA 处理后的大颚器(MO)和 X-器官鼻窦腺复合体(XO-SG)对卵母细胞直径的影响
Tab. 1 Effect of mandibular organ(MO) and X-organ-sinus gland(XO-SG) on oocyte diameters after eyestalk ablation treatment
n=20; $\bar{x} \pm SD$; μ m

培养时间 culture time	对照组 control	实验组 1 (MO) group 1				实验组 2 (MO+XO-SG) group 2			
		第 1 天	第 3 天	第 6 天	第 14 天	第 1 天	第 3 天	第 6 天	第 14 天
		1 d	3 d	6 d	14 d	1 d	3 d	6 d	14 d
0 h	337.22 $\pm$ 20.67 ^a	335.69 $\pm$ 19.20 ^a	332.30 $\pm$ 16.14 ^a	332.35 $\pm$ 23.66 ^a	334.42 $\pm$ 19.72 ^a	336.76 $\pm$ 23.56 ^a	336.14 $\pm$ 21.64 ^a	336.16 $\pm$ 20.30 ^a	339.20 $\pm$ 25.13 ^a
24 h	335.63 $\pm$ 24.43 ^a	378.02 $\pm$ 21.64 ^b	387.14 $\pm$ 16.24 ^b	415.39 $\pm$ 15.01 ^b	386.40 $\pm$ 17.89 ^b	338.42 $\pm$ 19.94 ^a	342.89 $\pm$ 11.01 ^a	377.24 $\pm$ 11.22 ^b	362.83 $\pm$ 46.96 ^b

注: 同一行中与对照组相比, 相同字母表示差异不显著($P > 0.05$), 相邻字母表示差异极显著($P < 0.01$).
Note: In the same line, the same letters with control group represent no significant difference ($P > 0.05$). The adjacent letters with control group represent exceedingly significant difference ($P < 0.01$).

物有很好的特异性, PCR 反应的各项条件都得到了较好的优化。两个基因均得到了有效而准确的扩增。

2.3.2 *FAMeT* 基因表达的变化 ESA 处理后 *FAMeT* mRNA 表达水平呈上升趋势。以未去眼柄的中华绒螯蟹 *FAMeT* mRNA 表达丰度作为对照组, 在 ESA 处理后的第 1 天和第 3 天, 其表达丰度同对照组相比无显著性差异($P>0.05$), 然而第 6 和 14 天表达丰度同对照组相比极显著上升至 265% ($P<0.01$, 图 1)。

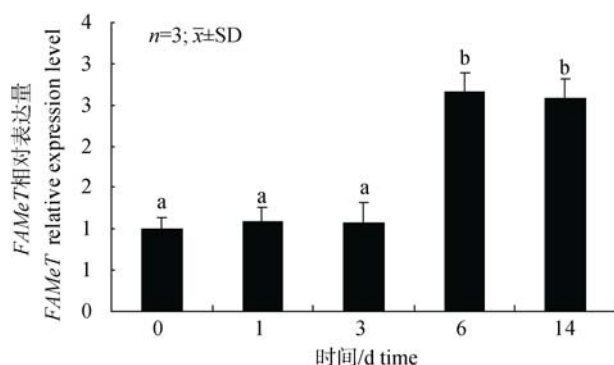


图 1 去眼柄对中华绒螯蟹大颚器 *FAMeT* 基因表达的影响 相同字母表示差异不显著($P>0.05$), 相邻字母表示差异极显著($P<0.01$).

Fig. 1 Effect of eyestalk ablation on *FAMeT* mRNA level in mandibular organ of *Eriocheir sinensis*
Same letters represent no significant difference ($P>0.05$).
Adjacent letters represent extremely significant difference ($P<0.01$).

3 讨论

MO 是甲壳动物体内唯一合成 MF 的器官^[1], 其对甲壳动物卵母细胞的发育具有明显的促进作用^[18]。Takac 等^[19]在蜘蛛蟹(*Libinia emarginata*)的血淋巴、精巢和卵巢中检测到 MF 结合蛋白的存在, 表明了性腺可能是 MF 的靶器官。红螯光壳螯虾(*Cherax quadricarinatus*)MO 合成和分泌的 MF 在卵黄发生时期能够激活蛋白激酶 C^[20], 刺激和提高克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)卵巢的成熟^[16]。本实验发现, ESA 处理解除了眼柄中 XO-SG 对 MO 的抑制作用, 使在体的 MO 合成 MF 的能力增强。随着 ESA 处理天数的增加, 到第 6 天解剖出来的 MO 对卵母细胞的促进作用最

强, 卵母细胞直径较对照组增加 23.76% ($P<0.01$)。

为探究 XO-SG 对卵母细胞发育的作用, 实验组 2 在 ESA 处理不同天数的 MO 中加入 XO-SG。XO-SG 复合体作为甲壳动物神经内分泌调控中心直接或者间接抑制性腺发育。赵维信等^[21]发现罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)眼柄粗提液能够抑制初级卵黄发生期以及成熟前卵巢的发育。本实验中, 加入 MO 和 XO-SG 的实验组同仅加入 MO 的实验组相比, 卵母细胞的直径明显减小。这既可能是 GIH 对卵巢有直接的抑制作用, 也可能是 XO-SG 合成的 MOIH 抑制了 MO 中 *FAMeT* 酶的活力^[22], 导致 MF 能力减弱从而使得卵母细胞直径减小。

FAMeT mRNA 广泛地存在于甲壳动物的组织中^[13], *FAMeT* mRNA 表达丰度的变化与甲壳动物的生长发育有密切的关系^[12]。红螯螯虾卵巢中 *FAMeT* mRNA 含量随卵黄发生有一定的变化^[23]。在雌性黄道蟹(*Cancer magister*)卵黄发生过程中 *FAMeT* 的转录水平增高。ESA 处理后的美洲螯龙虾(*Homarus americanus*)*FAMeT* mRNA 的表达水平在处理后的第 1 和 3 天基本保持不变, 第 6 天和 14 天 mRNA 表达水平上升 300%^[24]。在本实验中, MO 中 *FAMeT* mRNA 表达水平在 ESA 处理后第 1 天和 3 天也基本保持不变; 到第 6 天和 14 天 mRNA 的表达量显著上升至对照组的 265%; 与美洲螯龙虾的变化趋势基本相同。不同物种 *FAMeT* mRNA 表达水平的变化不同, 这可能是由物种间差异引起的, 环境状况、营养条件以及个体发育阶段等也可能对其产生影响^[25]。

综上所述, ESA 处理后, 眼柄中 XO-SG 分泌的 MOIH 被去除, *FAMeT* mRNA 相对表达量上升, 表明 XO-SG 中的 MOIH 对 MO 中 *FAMeT* mRNA 的表达有负调控作用。同时证实 ESA 处理不同天数后 MO 中 *FAMeT* mRNA 升高和 MO 对卵母细胞生长的促进作用是一致的。MO 中的 *FAMeT* mRNA 表达同 MO 的生物活性有着相关性, *FAMeT* 是促进甲壳动物性腺成熟重要调节因素。

参考文献:

- [1] Laufer H, Borst D, Baker F C, et al. Identification of a juvenile hormone-like compound in a crustacean[J]. Science, 1987, 235(1): 202–205.
- [2] Nagaraju G P C. Is methyl farnesoate a crustacean hormone? [J]. Aquaculture, 2007, 272(1–4): 39–54.
- [3] 陆剑峰, 赵维信. 十足目甲壳动物生殖激素对卵巢的作用及其调控[J]. 水产学报, 1999, 23(3): 229–233.
- [4] 李胜, 赵维信. 克氏原螯虾大颚器在卵巢发育周期中的组织结构变化[J]. 上海水产大学学报, 1999, 8(1): 12–18.
- [5] Nagaraju G P C, Reddy P R, Reddy P S. Mandibular organ its relation to body weight sex molt and reproduction in the crab *Oziotelphusa senex senex Fabricius* (1791) [J]. Aquaculture, 2004, 232(1–4): 603–612.
- [6] 宁黔冀. 甲壳动物激素及其应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 140–141.
- [7] Hinsch G W. Effect of mandibular organ implants upon spider crab ovary [J]. Trans Am Microsc Soc, 1980, 99(3): 317–322.
- [8] Wainwright G, Webster S G, Rees H H. Neuropeptide regulation of biosynthesis of the juvenoid, methyl farnesoate, in the edible crab, *Cancer pagurus* [J]. Biochem J, 1998, 334(3): 651–657.
- [9] 赵维信, 李胜. 克氏原螯虾大颚器对卵巢发育的影响[J]. 水产学报, 1999, 23(3): 229–232.
- [10] Liu L, Laufer H, Wang Y, Hayes T. A neurohormone regulating both methyl farnesoate synthesis and glucose metabolism in a crustacean [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 237(3): 694–701.
- [11] [11]Ruddell C J, Wainwright G, Geffen A, et al. Cloning, Characterization, and developmental expression of a putative farnesoic acid O-methyl transferase in the female edible crab *Cancer pagurus* [J]. Biol Bull, 2003, 205(3): 308–318.
- [12] Kuballa A V, Guyatt K, Dixon B, et al. Isolation and expression analysis of multiple isoforms of putative farnesoic acid O-methyltransferase in several crustacean species[J]. Gen-Comp Endocrinol, 2007, 150(1): 48–58 .
- [13] Gunawardene Y I, Tobe S S, Bendena W G, et al. Function and cellular localization of farnesoic acid O - methyltransferase (FAMeT) in the shrimp, *Metapenaeus ensis* [J]. Eur Biochem, 2002, 269(14): 3587–3595.
- [14] Keller R. Crustacean neuropeptides: structure, functions and comparative aspects [J]. Cell Mol Life Sci, 1992, 48(5): 439–448.
- [15] 杜育哲, 顾景龄, 吕宪禹, 等. 中华绒螯蟹大颚器分泌物的 HPLC 分析[J]. 水产科学, 2004, 23(6): 10–13.
- [16] Laufer H, Biggers W J, Ahl J S. Stimulation of ovarian maturation in the crayfish *Procambarus clarkii* by mthlasoate [J]. Gen Comp Endocrinol, 1998, 111(2): 113–118.
- [17] 陆剑峰, 万全, 吴旭干, 等. 早熟中华绒螯蟹眼柄视神经节对卵巢发育的生殖调控作用[J]. 台湾海峡, 2009, 11(4): 460–466.
- [18] Reddy P S, Ramanurthi R. Methyl farnesoate stimulates ovarian maturation in the freshwater crab, *Ozitelphusa seex Fabricius* [J]. Curr Sci, 1998, 74(1): 68–70.
- [19] Takac P, Laufer H, Prestwich G. Characterization of methyl farnesoate (MF) binding proteins and the metabolism of MF by some tissues of the spider crab *Libinia emarginata*[J]. Am Zool, 1993, 33: 10.
- [20] Soroka Y, Sagi A, Khalaila I, et al. Changes in protein kinase C during vitellogenesis in the crayfish *Cherax quadricarinatus* – possible activation by methyl farnesoate [J]. Gen Comp Endocrinol, 2000, 118(2): 200–208.
- [21] 赵维信, 贾江, 安苗. 外源激素和眼柄提取物对罗氏沼虾卵母细胞的离体诱导作用[J]. 上海水产大学学报, 1996, 5(4): 221–225.
- [22] Chung J S, Zmora N, Katayama H, et al. Crustacean hyperglycemic hormone (CHH) neuropeptides family: Functions, titer, and binding to target tissues [J]. Gen Comp Endocrinol, 2010, 166(3): 447–454.
- [23] 李嘉尧, 赵云龙. 红螯光壳螯虾(*Cherax quadricarinatus*) 卵黄发生的研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2008: 1–90.
- [24] Li Sheng, Jon A F, Kenneth C H, et al. Methyl farnesoate synthesis in the lobster mandibular organ: The roles of HMG-CoA reductase and farnesoic acid O-methyltransferase[J]. Comp Biochem Physiol, 2010, 155(1): 49–55.
- [25] Larsen D A, Beckman B R, Dickhoff W W. The effect of low temperature and fasting during the winter on metabolic stores and endocrine physiology (Insulin, insulin-like Growth Factor- I , and Thyroxine) of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* [J]. Gen Comp Endocrinol, 2001, 123(3): 308–323.

***FAMeT* expression and ovarian development following eyestalk ablation in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)**

GUO Min¹, WEI Hua^{1,2}, TAO Xianji¹, WU Tingting¹

1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Shanghai Vocational and Technical College of Agriculture and Forestry, Shanghai 201600, China

Abstract: We evaluated the role of methyl farnesoate (MF) during ovarian development in *Eriocheir sinensis*. We cultured oocytes with mandibular organ (MO) as group 1, and oocytes with MO and X-organ-sinus gland (XO-SG) as group 2 *in vitro*. Oocytes cultured with medium were set as control. MO excretion promoted oocyte maturation by increasing the oocyte diameter at the 1st, 3rd, 6th, and 14th day after eyestalk ablation, particularly on the 6th day ($P < 0.01$). Incubation with XO-SG significantly inhibited oocyte development ($P < 0.05$). We used fluorescent quantitative RT-PCR to quantify *FAMeT* expression. Levels were 265% higher than 6 and 14 days after eyestalk ablation, and were significantly higher than that in the control group (without MO) ($P < 0.01$). *FAMeT* expression levels were lower on day 14 than that on day 6 and there was no change on day 1 and day 3 after eyestalk ablation ($P > 0.05$). Our results suggest that the functional material in MO induces oocyte maturation, with the effect being strongest 6 days after eyestalk ablation. MO *FAMeT* mRNA was downregulated by the XO-SG causing inhibition of oocyte maturation *in vitro*.

Corresponding author: WEI Hua. Tel: +81-21-57823508; E-mail: weih@shafc.edu.cn