

DOI: 10.12264/JFSC2022-0429

杂交种“金虎石斑鱼”与棕点石斑鱼卵巢发育及性类固醇激素水平比较

邱弈树^{1, 2}, 丁小雨^{1, 2}, 李振通^{2, 3}, 段鹏飞^{2, 4}, 王心怡^{2, 4}, 黎琳琳^{2, 3}, 王林娜^{2, 3}, 刘阳^{2, 3}, 马文辉⁵, 庞尊方⁵, 李胜忠¹, 田永胜^{2, 3}

1. 新疆农业大学生命科学学院, 新疆维吾尔自治区 乌鲁木齐 830052;
2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室, 山东 青岛 266071;
3. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266071;
4. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;
5. 莱州明波水产有限公司, 山东 莱州 261400

摘要: 为了探究杂交种“金虎石斑鱼”(*Epinephelus fuscoguttatus* ♀×*Epinephelus tukula* ♂) 和母本棕点石斑鱼 (*Epinephelus fuscoguttatus*) 的卵巢发育和血清中性类固醇激素水平的变化, 对 10、18、24、36 月龄的金虎石斑鱼和棕点石斑鱼进行了卵巢组织切片, 并采用酶联免疫吸附法测定其血清中的雌二醇(E2)、11-酮基睾酮(11-KT)、睾酮(T)、孕酮(P)含量。结果显示, 杂交种金虎石斑鱼卵巢正常发育, 没有出现卵母细胞萎缩、退化的现象, 且 36 月龄时金虎石斑鱼卵巢发育至 III 期早期, 卵母细胞进入大生长期体积明显增大, 核仁多位于核膜外侧。棕点石斑鱼卵巢发育较快, 36 月龄时卵巢已发育至 III 期末期, 卵母细胞与核体积进一步增大。卵膜外又形成了一层滤泡膜, 形成双层滤泡膜结构。金虎石斑鱼与棕点石斑鱼血清中 E2、11-KT、P 的水平变化趋势相似, 呈现先升后降的趋势, 且在 24 月龄时达到最大, 但棕点石斑鱼高于金虎石斑鱼。金虎石斑鱼血清中 T 的水平与其他性类固醇激素变化一致: 在 24 月龄时达到最大, 在 36 月龄时显著下降, 而棕点石斑鱼血清中 T 在 36 月龄时依然维持和 24 月龄相似的高水平。棕点石斑鱼血清中 E2、T、P 的水平在 24 月龄时显著高于金虎石斑鱼 ($P<0.05$)。结果表明, 杂交种金虎石斑鱼在 36 月龄前的卵巢可正常发育, 但较同期母本棕点石斑鱼卵巢发育慢, 金虎石斑鱼各发育时期血清中 E2、11-KT、P、T 水平略低于或显著低于棕点石斑鱼。研究结果表明杂交种金虎石斑鱼在细胞学上具有良好的育性基础, 可为石斑鱼杂交种性腺发育及可育性研究提供细胞和血清学基础。

关键词: 金虎石斑鱼; 棕点石斑鱼; 杂交; 卵巢发育; 性类固醇激素

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2023)04-0457-11

棕点石斑鱼 (*Epinephelus fuscoguttatus*) 体表淡黄褐色, 俗称“老虎斑”, 主要在我国南部沿海地区养殖。其肉质鲜美、有很强的抗病能力、繁殖期可产生大量优质卵子, 但是生长速度慢^[1]。自

然海域的棕点石斑鱼初次性成熟为 4~5 龄, 繁殖期大多为每年的 11 月至次年 2 月, 每月高峰期为新月的前几天^[2]。蓝身大斑石斑鱼 (*Epinephelus tukula*) 因为体表呈灰色, 且有较大的褐色斑点,

收稿日期: 2022-12-16; **修订日期:** 2023-01-18.

基金项目: 山东省泰山产业领军人才工程项目(LJNY202109); 财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系资助项目(CARS-47); 山东省重点研发计划项目(2022LZGC016, 2021LZGC028); 海南省重点研发项目(ZDYF2022XDNY243); 中国水产科学研究院基本科研业务费项目(2020XT06, 2020TD19, 2020TD25).

作者简介: 邱弈树(1997-), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产种质资源与苗种工程. E-mail: yishuqiu97@163.com

通信作者: 田永胜, 研究员, 研究方向为鱼类种质冷冻保存及遗传育种, E-mail: tianys@ysfri.ac.cn; 李胜忠, 副教授, 研究方向为水产动物增殖与繁殖生理学, E-mail: xndlishengzhong@sina.cn

故俗称金钱斑。金钱斑成年体重可达 100 kg, 属于大型石斑鱼, 主要分布在我国南海海域。蓝身大斑石斑鱼生长速度较快, 但雄鱼产精量很少, 且雌鱼在人工养殖环境下难于产卵, 因此蓝身大斑石斑鱼无法大规模推广养殖^[3]。

杂交育种是通过不同物种、品种或品系之间杂交获得新的养殖品种, 在鱼类育种中应用广泛, 经济效果显著。与亲本相比, 杂交子代可能会在某些性状上会超过亲本^[4], 例如杂交子代生长更快^[5]、抗病力更强^[6]、更耐低氧^[7]等。田永胜等^[3]首次利用蓝身大斑石斑鱼冷冻精子与棕点石斑鱼进行杂交育种实践, 突破两个物种之间地理分布不同、繁殖习性不同造成的生殖隔离, 获得了具有高受精率、高孵化率、低畸形率、生长速度快等优势 的 杂 交 子 代 “ 金 虎 石 斑 鱼 ” (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus tukula* ♂)。本团队对金虎石斑鱼与亲本的形态差异^[8]、后代生长发育^[3]、子代的染色体核型^[9]、遗传多样性^[10]、低温耐受能力^[11]和低氧耐受能力^[12]等进行了研究。对于鱼类杂交种可育性一直是本领域关注的焦点, 鱼类远缘杂交种实际应用的关键一环是它的可育性。杂交种可育必然要突破生殖隔离的限制, 可育杂交种可以为研究克服生殖隔离提供良好的材料和模型。杂交种金虎石斑鱼的性腺发育特征及可育性还未有相关研究报道。

杂交种可育性往往通过染色体数目是否成对、性腺发育是否正常以及回交、自交试验能否产生后代来判定^[13]。金虎石斑鱼的染色体核型与母本棕点石斑鱼一致, 都为 $2n=2sm+46t$ ^[9], 表明金虎石斑鱼育性具有良好的遗传学基础。鱼类的生殖研究, 如性腺分化时间、性别变化、产卵季节和持续时间、繁殖力等等, 都需要了解鱼体性腺的发育阶段。了解鱼类性腺结构是研究鱼类性腺发育的基础, 组织学是研究鱼类性腺结构最常用的方法之一。组织学方法耗时长、费用高, 但可以准确直观地观察生殖细胞的发育情况, 判断鱼类的性腺发育阶段^[14]。性类固醇激素主要在性腺中产生, 血清性类固醇激素水平在雌雄性腺成熟期间经历了重要的变化。血清性类固醇激素浓度变化诱导下丘脑、垂体和性腺内的正反馈和负

反馈控制, 这些过程直接负责控制配子发育和生殖活动^[15]。性腺发育和性类固醇激素的相应变化对于了解鱼类性成熟和产卵模式至关重要^[16-17], 血清类固醇激素也有助于了解鱼类内分泌对生殖的控制^[18]。淡水和海洋鱼类中血清类固醇激素在年度生殖周期中的季节性变化及其在性腺发育过程中的作用已被广泛研究^[16,19-20], 通常研究的鱼类性类固醇激素包括雌二醇(E2)、11-酮基睾酮(11-KT)、睾酮(T)和孕酮(P)。

本研究拟以杂交种“金虎石斑鱼”和其母本棕点石斑鱼为研究对象, 对两种鱼的卵巢组织形态结构、性类固醇激素水平进行研究。从杂交子代自身角度出发, 了解其卵母细胞的发育过程、性类固醇激素变化规律, 探究杂交种金虎石斑鱼性腺发育特征及生育能力, 为石斑鱼杂交育种及杂交种的养殖提供理论和技术资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究团队在 2019 年 4 月、2020 年 3 月、2021 年 6 月分别利用蓝身大斑石斑鱼冷冻精子、棕点石斑鱼鲜精与棕点石斑鱼卵进行人工授精, 构建并养成了 1、3、13 个金虎石斑鱼家系和 1、1、3 棕点石斑鱼家系。每年家系留 500 条进行养殖, 这些家系均在山东省莱州明波水产有限公司工厂化循环水车间进行对比养殖。工厂化养殖条件为: 水体体积 40 m³, 水温 21~26 °C, 盐度 28~30, 溶解氧 6~9 mg/L, 投喂人工配合饲料[三通生物工程(潍坊)有限公司]进行养殖, 苗种期每天投喂 2 次, 根据鱼的生长状况调整饲料规格和投喂量, 以饱食为准; 成鱼期每天投喂 1 次, 投饲量为鱼体重的 2%~3%。

1.2 取样方案

取 10、18、24、36 月龄的金虎石斑鱼各 10 条, 10、18、24 月龄的棕点石斑鱼各 10 条, 36 月龄的棕点石斑鱼 3 条, 各月龄的金虎石斑鱼和棕点石斑鱼为同批卵的半同胞家系。使用 MS-222 麻醉后测量体重和体长数据, 通过尾部静脉采集血液。血液静置过夜, 3500 g 离心 5 min, 取上清于液氮中速冻, 后保存于 -80 °C 冰箱中待用。每组再随机抽

取3条进行解剖,取出卵巢。卵巢取出后先于波恩试液中固定24 h,后转于70%的乙醇中保存。

1.3 卵巢组织切片

将卵巢从70%的乙醇中取出,将组织修成3~5 mm³大小,放入塑料盒中做好标记。经过一系列梯度浓度的乙醇脱去组织中的水分,二甲苯透明。将组织从塑料盒中取出放入盛有蜡液的模具中,蜡液完全凝固后,将蜡块修整平整后用切片机连续切片,切片厚度5~8 μm。展片、粘片、烘干后,苏木精-伊红(HE)染色,中性树胶封片。用显微镜观察、拍照,观察卵巢发育。

1.4 类固醇激素水平测定

采用酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)对血清中的雌二醇(estradiol, E2)、11-酮基睾酮(11-keto testosterone, 11-KT)、睾酮(testosterone, T)、孕酮(progesterone, P)4种与性腺发育相关的激素进行测定。实验操作严格按照 Cayman Chemical Company 的对应试剂盒说明

书进行。

1.5 数据分析

实验数据经 Excel 处理,用平均值±标准差($\bar{x} \pm SD$)表示。统计分析采用 SPSS 26.0 软件进行差异显著性分析,利用单因素方差分析法对数据进行方差分析,差异显著时用 Duncan's 法多重比较,比较结果用字母标记法,在同一系列中字母相同表示差异不显著($P>0.05$),字母不同表示差异显著($P<0.05$)。采用 Origin 2021 制作图表。

2 结果与分析

2.1 金虎石斑鱼性腺发育组织学观察

10月龄体长为(18.53±0.55) cm,性腺未分化。性腺原基中可观察到性原细胞,性原细胞呈圆形或椭圆形,细胞界限明显(图1a)。

18月龄体长为(33.50±1.50) cm,卵巢处于I期和II期的过渡期。卵母细胞较小,直径大多不超过20 μm,细胞嗜碱性,被染成蓝紫色(图1b)。

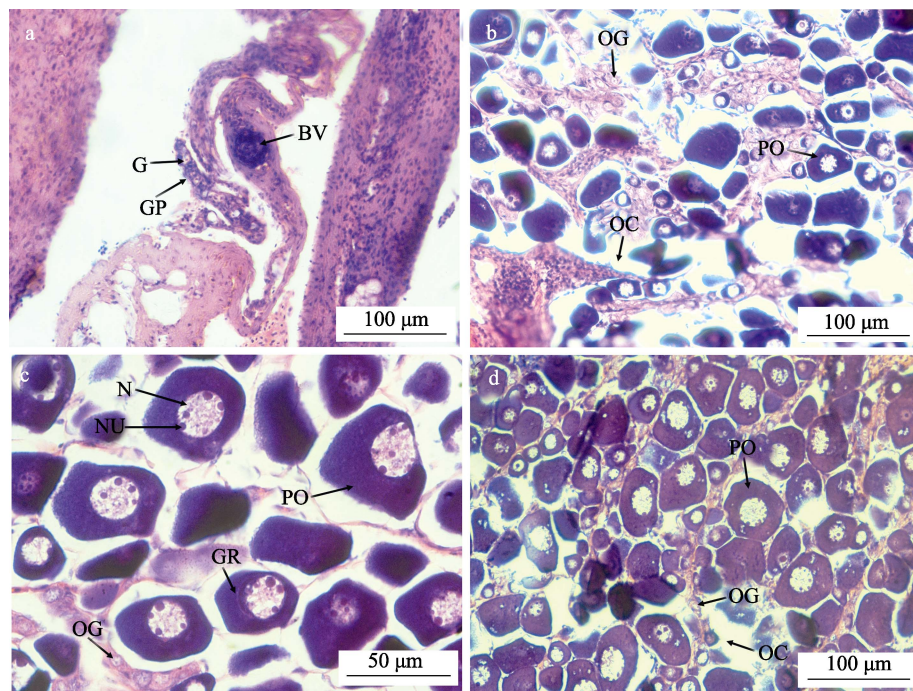


图1 金虎石斑鱼性腺发育组织学观察

a. 10月龄性腺切片; b. 18月龄性腺切片; c. 24月龄性腺切片; d. 36月龄性腺切片. G: 性原细胞; GP: 性腺原基; BV: 血管; OG: 卵原细胞; OC: 卵巢腔; PO: 初级卵母细胞; GR: 生长环; N: 细胞核; NU: 核仁。

Fig. 1 Histological observation of gonad development in Jinhu grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀×*Epinephelus tukula* ♂)

a. Gonad sections at 10 months of age; b. Gonad sections at 18 months of age; c. Gonad sections at 24 months of age; d. Gonad sections at 36 months of age. G: gonium; GP: gonadal primordium; BV: blood vessel; OG: oogonium; OC: ovarian cavity; PO: primary oocyte; GR: growth ring; N: nucleus; NU: nucleolus.

24 月龄体长为 (37.47 ± 0.65) cm, 卵巢发育至 II 期中晚期。卵母细胞处于小生长期, 细胞增大, 细胞质增加, 出现生长环, 卵母细胞大小为 20–50 μm 。核仁增多, 出现在细胞核的外围(图 1c)。

36 月龄体长为 (41.30 ± 1.50) cm, 第 III 时相早期。卵母细胞进入大生长期后体积明显增大, 大小为 60 μm 左右, 卵母细胞间间隙减小。胞质出现大小不一的油滴, 核仁紧贴核膜外侧(图 1d)。

2.2 棕点石斑鱼性腺发育组织学观察

10 月龄体长为 (14.60 ± 0.53) cm, 卵巢腔发育完成。卵母细胞形态不规则, 细胞较小, 直径 20 μm 左右。细胞质少且均匀, 核内有网状的染色质(图 2a)。

18 月龄体长为 (27.17 ± 1.31) cm, 卵巢处于 II 期。卵母细胞, 胞质嗜碱性强, 处于卵母细胞小生长期。细胞体积增大, 直径 50 μm 。细胞核和细胞质有所增长, 多呈圆形或不规则形(图 2b)。

24 月龄体长为 (28.53 ± 1.19) cm, 为第 III 期早

期, 卵母细胞刚进入大生长期, 直径 60 μm 。细胞基本呈圆形, 卵母细胞滤泡膜仍为一层。核周边缘胞质出现油滴, 油滴大小不一(图 2c)。

36 月龄体长为 (36.93 ± 2.38) cm, 为第 III 期晚期。相较第 III 时相早期, 卵母细胞明显增大直径达到 80 μm 。卵膜外又形成了一层滤泡膜, 形成双层滤泡膜结构(图 2d)。

2.3 金虎石斑鱼与棕点石斑鱼血清中雌激素水平

从图 3 中可以看出, 金虎石斑鱼与棕点石斑鱼血清中雌二醇(E2)水平都呈现一个先上升再下降的趋势, 并在 24 月龄时达到最大, 显著高于 10、18、36 月龄($P < 0.05$), 分别为 (71.17 ± 8.69) pg/mL、 (293.57 ± 115.31) pg/mL。棕点石斑鱼血清中 E2 水平在各个时期都显著高于金虎石斑鱼($P < 0.05$)。

如图 4 所示, 金虎石斑鱼和棕点石斑鱼血清中孕酮(P)激素的变化趋势与雌二醇一致。金虎石斑鱼血清中 P 的水平在各个时期都有显著差异($P < 0.05$), 棕点石斑鱼在 10 月和 18 月龄时血清中

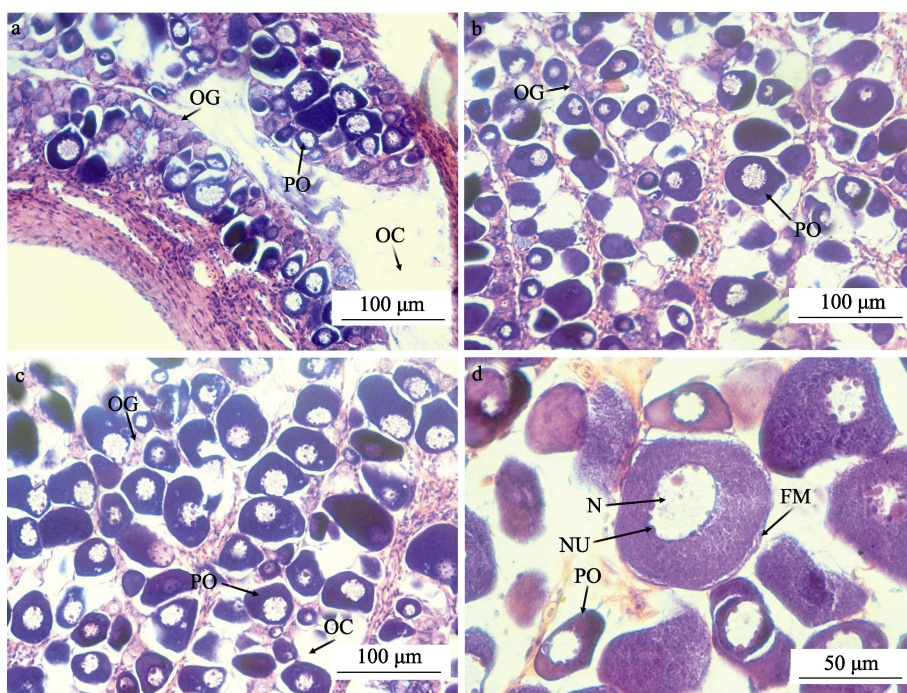


图 2 棕点石斑鱼性腺发育组织学观察

a. 10 月龄性腺切片; b. 18 月龄性腺切片; c. 24 月龄性腺切片; d. 36 月龄性腺切片. OG: 卵原细胞; OC: 卵巢腔; PO: 初级卵母细胞; FM: 滤泡膜; N: 细胞核; NU: 核仁.

Fig. 2 Histological observation of gonad development in *Epinephelus fuscoguttatus*

a. Gonad sections at 10 months of age; b. Gonad sections at 18 months of age; c. Gonad sections at 24 months of age; d. Gonad sections at 36 months of age. OC: ovarian cavity; OG: oögonium; PO: primary oocyte; FM: follicular membrane; N: nucleus; NU: nucleolus.

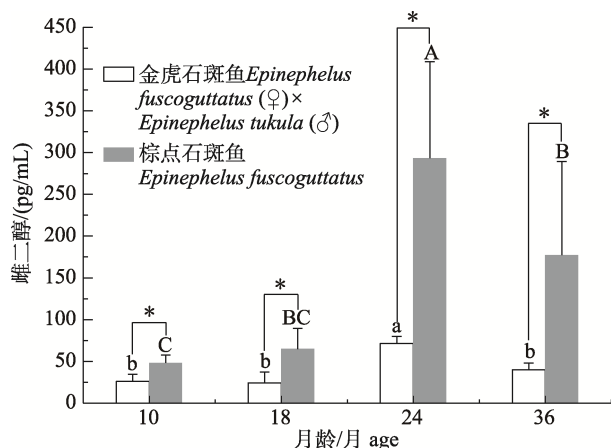


图3 不同月龄时期金虎石斑鱼与棕点石斑鱼血清中雌二醇(E2)激素水平

同一种鱼上标不同字母表示不同月龄间差异显著($P<0.05$);

*表示同一月龄的两种鱼差异显著($P<0.05$).

Fig. 3 Serum estradiol (E2) levels of Jinhu grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus tukula* ♂) and *Epinephelus fuscoguttatus* at different ages

Different letters in the same fish indicate significant difference among different ages ($P<0.05$); * means significant difference between the two fish at the same age ($P<0.05$).

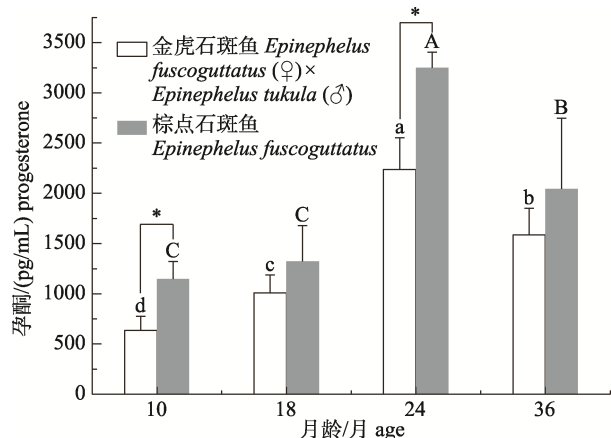


图4 不同月龄时期金虎石斑鱼与棕点石斑鱼血清中孕酮(P)激素水平

同一种鱼上标不同字母表示不同月龄间差异显著($P<0.05$);

*表示同一月龄两种鱼差异显著($P<0.05$).

Fig. 4 Serum progesterone hormone levels of Jinhu grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus tukula* ♂) and *Epinephelus fuscoguttatus* at different ages

Different letters in the same fish indicate significant difference among different groups ($P<0.05$); * means significant difference between the two fish at the same age ($P<0.05$).

P 的水平无显著差异($P>0.05$), 但与 24 月龄和 36 月龄有显著差异($P<0.05$)。金虎石斑鱼和棕点石斑鱼血清中 P 的水平均在 24 月龄时达到最大, 分别为 (2236.85 ± 316.62) pg/mL、 (3250.45 ± 153.31) pg/mL。

棕点石斑鱼血清中 P 的水平在 10、24 月龄时显著高于金虎石斑鱼($P<0.05$)。

2.4 金虎石斑鱼与棕点石斑鱼血清中雄激素水平

从图 5 可以看出, 金虎石斑鱼与棕点石斑鱼相比, 血清中 11-酮基睾酮(11-KT)激素水平在各个时期都没有显著差异($P>0.05$)。在金虎石斑鱼卵巢发育过程中, 24 月龄时血清中 11-KT 水平最高 (40.28 ± 23.29) pg/mL, 显著高于 10 和 18 月龄($P<0.05$), 但与 36 月龄无显著差异($P>0.05$)。棕点石斑鱼血清中 11-KT 水平也在 24 月龄时达到顶峰 (53.06 ± 15.74) pg/mL, 显著高于其他各时期($P<0.05$)。

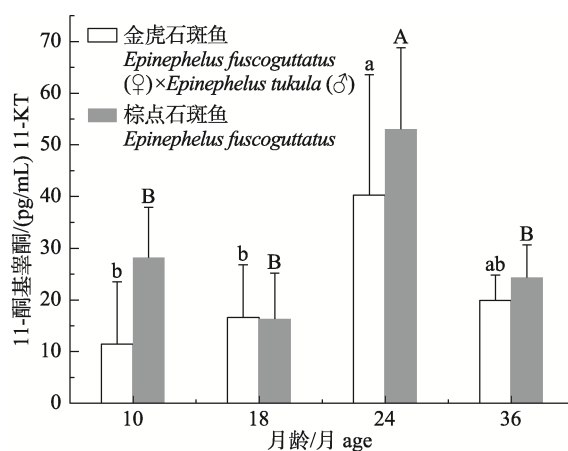


图5 不同月龄时期金虎石斑鱼与棕点石斑鱼血清中 11-酮基睾酮(11-KT)激素水平

同一种鱼上标不同字母表示不同月龄间差异显著($P<0.05$);

*表示同一月龄两种鱼差异显著($P<0.05$).

Fig. 5 Serum 11-keto testosterone (11-KT) levels of Jinhu grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus tukula* ♂) and *Epinephelus fuscoguttatus* at different ages

Different letters in the same fish indicate significant difference among different ages ($P<0.05$); * means significant difference between the two fish at the same age ($P<0.05$).

图 6 显示出金虎石斑鱼和棕点石斑鱼血清中睾酮(T)激素水平的变化趋势并不一致, 棕点石斑鱼血清中 T 的水平在 10、24、36 月龄时显著高于金虎石斑鱼($P<0.05$)。金虎石斑鱼在 10 月龄和 18 月龄时, 血清中 T 的水平处于较低的水平, 在 24 月龄时最大 (53.22 ± 18.96) pg/mL, 但在 36 月龄时下降至和 18 月龄相似的水平。棕点石斑鱼血清中 T 的水平在 10 到 24 月龄时的变化趋势与金虎石斑鱼一致, 但在 36 月龄时血清中 T 的水平并未下降而是维持在和 24 月龄相似的较高水平。

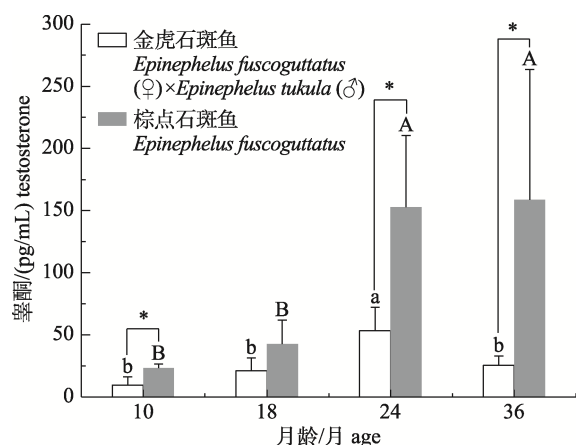


图 6 不同月龄时期金虎石斑鱼与棕点石斑鱼血清中睾酮(T)激素水平

同一种鱼上标不同字母表示不同月龄间差异显著($P < 0.05$); *表示同一月龄两种鱼差异显著($P < 0.05$).

Fig. 6 Serum testosterone (T) levels of Jinhu grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus tukula* ♂) and *Epinephelus fuscoguttatus* at different ages

Different letters in the same fish indicate significant difference among different groups ($P < 0.05$); * means significant difference between the two fish at the same age ($P < 0.05$).

3 讨论

棕点石斑鱼与蓝身大斑石斑鱼属于同属不同种, 该两个物种之间的杂交属于远缘杂交。杂交种的可育性研究是杂交育种过程中重要的研究方向, 国内外研究发现鱼类杂交种的可育性大致可以分为 4 种类型^[21]: 一是完全可育型, 杂种 F_1 雌雄个体都可发育并达到性成熟。如棕点石斑鱼 × 鞍带石斑鱼(*Epinephelus lanceolatus*)杂交获得了 F_1 “虎龙杂交斑”, F_1 自交又获得了 F_2 ^[22]。二是障碍性两性能育, 即杂种 F_1 中只有一部分可以达到性成熟。如刘筠^[23]对红鲫(*Carassius auratus*)和湘江野鲫(*Cyprinus carpio*)杂交子代的生殖腺组织学研究发现, 可育雌性占 F_1 总数的 44.3%, 可育雄性仅占 4.67%。三是单性可育, 杂种 F_1 中只有雌性或者雄性能够达到性成熟。如对褐鳟(*Salmo trutta*)和大西洋鲑(*Salmo salar*)的杂交子代的性腺发育研究发现, 雄性 F_1 的精巢发育正常, 但雌性 F_1 的卵巢发育受到干扰^[24]。还有一些杂交子代是完全不育的, 如箕作氏黄姑鱼(*Nibea mitsukurii* ♀) × 白姑鱼(*Pennahia argentata* ♂)杂交种的性腺都很小, 杂交鱼的生殖腺中没有观察到 vasa 阳性细胞^[25]; 黄

颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco* ♀) × 瓦氏黄颡鱼(*Pelteobagrus vachelli* ♂)杂交子代“黄优 1 号”雄鱼精巢中虽然有精子产生, 但活力低没有授精能力, 雌鱼卵巢退化, 为白色细线状, 故判断杂交黄颡鱼不可育^[26]。在其他杂交石斑鱼中, Muzaki 等^[27]对棕点石斑鱼与清水石斑鱼(*Epinephelus polyphekadion*)的杂交子代进行组织学观察, 发现性腺发育良好, 其中一尾雌性繁殖力很强, 判定杂交石斑鱼可育。Li 等^[28]对 10~43 月龄的斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)与鞍带石斑鱼的二倍体杂交子代性腺发育进行研究, 发现二倍体杂交石斑鱼在 43 月龄时发育正常, 卵黄发生。棕点石斑鱼与鞍带石斑鱼的杂交子代“虎龙杂交斑”可以达到性成熟, 并性逆转为雄性^[29]。“虎龙杂交斑”目前已有回交、自交成功的报道^[30,22], 可以判定“虎龙杂交斑”可育。

本研究中, 通过对 36 月龄前金虎石斑鱼性腺发育的组织学观察, 未发现卵母细胞萎缩、退化的现象, 说明金虎石斑鱼 36 月龄前卵巢发育正常, 有较好细胞学育性基础。但是相较于同时期的棕点石斑鱼的卵巢发育, 金虎石斑鱼的卵巢发育较为迟缓, 这与云纹石斑鱼(*Epinephelus moara*)与鞍带石斑鱼的杂交子代“云龙石斑鱼”^[31]、泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)与大鳞副泥鳅(*Paramisgurnus dabryanus*)的杂交子代^[32]、黄金鲈(*Perca flavescens*)与伊犁鲈(*Perca schrenki*)的杂交子代^[33]卵巢发育慢于母本的报道相一致。在生物生长过程中涉及到生长能量和生殖能量的分配, 性成熟较早的个体, 在性成熟之前主要将能量分配在配子生长发育方面, 身体生长就会减慢。例如半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)和金钱鱼(*Scatophagus argus*), 它们的雄性个体性成熟时间早于雌性, 这可能是雄性个体显著小于同期雌性个体的原因之一^[34-35]; 相反, 如果雄性个体性成熟晚, 同时期的雄性个体大小就会超过雌性个体, 例如尼罗罗非鱼和南方蓝鳍金枪鱼(*Thunnus maccoyii*)^[36-37]。黄金鲈与伊犁鲈杂交子代的繁殖期比黄金鲈推迟 1 年, 杂交鲈性成熟推迟使其保持较高的生长速度^[33]。金虎石斑鱼的卵巢发育慢于母本棕点石斑鱼, 这一点也可能是杂交种金虎

石斑鱼生长优势形成的因素之一。

性类固醇激素可调控鱼类的性别分化过程, 并影响生殖细胞的发育, 对于促进性腺发育和维持性别特征具有重要作用^[38], 通过测定鱼类血液中性类固醇激素含量可以直接推断出其机体的性腺发育状况^[39]。在本研究中, 棕点石斑鱼血清中 E2 的水平在各个时期都显著高于金虎石斑鱼。在 10 和 18 月龄的金虎石斑鱼和棕点石斑鱼中检测到较低水平的 E2, 表明它们在卵巢第一个发育阶段已开始发挥调节作用, 即使与 24 个月龄的鱼相比水平很低。低水平的 E2 足以刺激卵原细胞的有丝分裂增殖, 卵原细胞进入减数分裂, 产生初级卵母细胞^[40]。本研究结果表明, 棕点石斑鱼血清中的 E2 浓度在卵巢 III 期早期时维持较高水平, 末期呈下降趋势。与雌性俄罗斯鲟 (*Acipenser gueldenstaedti*) 和闪光鲟 (*Acipenser stellatus*) 相似, 雌性俄罗斯鲟和闪光鲟的血清 E2 水平在 II 期都很低, 在卵黄发生期间(III 期)显著升高。当卵黄发生完成时(III~IV 和 IV 阶段), 雌性俄罗斯鲟和闪光鲟的 E2 水平显著下降^[41]。这一下降可能是由于有效的 E2 浓度没有更新, 这些 E2 被用来激活内源生长。这一发现也与 Heidari 等^[42]获得的结果相似, 卵母细胞初级生长阶段的高水平血浆 E2 可能与卵巢生殖细胞的增殖有关。因为 P 是 E2 的前体, 所以金虎石斑鱼和棕点石斑鱼血清中 P 的水平变化与 E2 相似。

尽管 11-KT 在硬骨鱼中被认为是雄性雄激素, 但在金虎石斑鱼和母本棕点石斑鱼血清中也被检出, 在雌性赤点石斑鱼 (*Epinephelus akaara*)^[43]、澳洲无须鳕 (*Merluccius australis*)^[44]、蜂巢石斑鱼 (*Epinephelus merra*)^[45] 中也检测出了 11-KT。尽管对于 11-KT 在雌性生殖生理中的作用还没有确切的了解, 但对刺激卵泡破裂、卵母细胞释放以及产卵时行为变化是必要的^[46]。Matsubara 等^[47]认为雌鳗 (*Anguilla japonica*) 鱼体内的 11-KT 在控制卵巢发育前期卵母细胞的生长中起重要作用, 并且参与了卵子发生的后期阶段。在大西洋鲑中 11-KT 与卵黄蛋白原的直接关系表明, 11-KT 可能在卵母细胞发育过程中起作用^[48]。T 可以被 cyp19 转化为 E2, E2 通过激活卵黄蛋白原(VTG)形成而

参与雌性鱼类的卵黄发生。除了 E2 合成的前体外, T 还可以在体外增强促性腺激素(GTHs)的刺激作用, 还可能通过在最终卵母细胞成熟过程中启动生发泡破裂(GVBD)来促进卵母细胞的生长^[49]。T 作为 E2 和 11-KT 的前体, 其变化趋势与 E2 和 11-KT 相同, 但在 36 月龄棕点石斑鱼血清中仍有较高水平的 T。Kobayashi 等^[50]认为 T 水平的升高是卵巢与完全成熟的卵母细胞紧密结合并准备排卵的标志, T 水平的增加可能是由于通过芳香化过程停止了 T 向其他类固醇的转化。值得强调的是, T 在卵母细胞形成和维持的最终过程中是至关重要的, 需要保持 T 水平高于一定的阈值^[51]。Poortenaar 等^[52]也在黄尾鲷 (*Seriola lalandi lalandi*) 中确定, 在卵母细胞的卵黄形成和最终成熟期间 T 浓度较高。

4 结论

本研究通过对金虎石斑鱼和棕点石斑鱼卵巢的组织学观察和血清中性类固醇激素的测定, 发现杂交种金虎石斑鱼的卵巢可正常发育, 没有出现卵母细胞萎缩、退化的现象, 但比没有母本棕点石斑鱼卵巢发育慢。36 月龄时金虎石斑鱼卵巢发育至 III 期早期, 棕点石斑鱼卵巢发育至 III 期末期。金虎石斑鱼各发育时期血清中 E2、11-KT、P、T 水平低于或显著低于母本棕点石斑鱼。以上结果表明杂交种金虎石斑鱼性成熟水平显著低于母本, 但杂交种金虎石斑鱼是否具有繁育能力, 还需长时间和深入的跟踪研究。

参考文献:

- [1] Chen C, Kong X D, Li Y L, et al. Embryonic and morphological development in the larva, juvenile, and young stages of *Epinephelus fuscoguttatus* (♀) × *E. lanceolatus* (♂)[J]. Progress in Fishery Sciences, 2014, 35(5): 135-144. [陈超, 孔祥迪, 李炎璐, 等. 棕点石斑鱼(♀)×鞍带石斑鱼(♂)杂交子代胚胎及仔稚幼鱼发育的跟踪观察[J]. 渔业科学进展, 2014, 35(5): 135-144.]
- [2] Pears R J, Choat J H, Mapston B D, et al. Reproductive biology of a large, aggregation-spawning serranid, *Epinephelus fuscoguttatus* (Forsska'l): management implications[J]. Journal of Fish Biology, 2007(71): 795-817.
- [3] Tian Y S, Tang J, Ma W H, et al. Development and growth

- of hybrid offspring of brown grouper *Epinephelus fuscoguttatus*(♀) × blue speckled grouper *Epinephelus tukula*(♂) using cryopreserved sperm[J]. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(6): 36-47. [田永胜, 唐江, 马文辉, 等. 蓝身大斑石斑鱼冷冻精子(♂)与棕点石斑鱼(♀)杂交后代发育及生长特征分析[J]. 渔业科学进展, 2019, 40(6): 36-47.]
- [4] Chen J, Luo M, Li S N, et al. A comparative study of distant hybridization in plants and animals[J]. Science China Life Sciences, 2018, 61(3): 285-309.
- [5] Guan W Z, Qiu G F, Feng-Liu. Transcriptome analysis of the growth performance of hybrid mandarin fish after food conversion[J]. PLoS One, 2020, 15(10): e0240308.
- [6] Meidong R, Khotchanalekha K, Doolgindachbaporn S, et al. Evaluation of probiotic *Bacillus aerius* B81e isolated from healthy hybrid catfish on growth, disease resistance and innate immunity of Pla-mong *Pangasius bocourti*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 73: 1-10.
- [7] Zhong X X, Wang X Z, Zhou T, et al. Genome-wide association study reveals multiple novel QTL associated with low oxygen tolerance in hybrid catfish[J]. Marine Biotechnology, 2017, 19(4): 379-390.
- [8] Wu Y P, Tian Y S, Li Z T, et al. Analysis on morphological difference between hybrid *Epinephelus fuscoguttatus* ♀×*E. tukula* ♂ and its parents[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2019, 39(6): 17-22. [吴玉萍, 田永胜, 李振通, 等. 棕点石斑鱼(♀)×蓝身大斑石斑鱼(♂)杂交后代与亲本的形态差异[J]. 广东海洋大学学报, 2019, 39(6): 17-22.]
- [9] Wu Y P, Tian Y S, Li Z T, et al. Karyotype analysis of hybrids of *Epinephelus fuscoguttatus*(♀) × *Epinephelus tukula*(♂)[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2021, 41(1): 119-123. [吴玉萍, 田永胜, 李振通, 等. 棕点石斑鱼(♀)与蓝身大斑石斑鱼(♂)杂交子代核型分析[J]. 广东海洋大学学报, 2021, 41(1): 119-123.]
- [10] Wu Y P, Tian Y S, Wang L N, et al. Genetic diversity analysis of *Epinephelus fuscoguttatus*(♀) and *E. tukula*(♂) hybrids[J]. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(6): 25-32. [吴玉萍, 田永胜, 王林娜, 等. 棕点石斑鱼(♀)与蓝身大斑石斑鱼(♂)及其杂交子代遗传多样性分析[J]. 渔业科学进展, 2021, 42(6): 25-32.]
- [11] Chen S, Tian Y S, Li Z T, et al. Heterosis in growth and low temperature tolerance in Jinhu grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus tukula* ♂)[J]. Aquaculture, 2023, 562: 738751.
- [12] Duan P F, Tian Y S, Li Z T, et al. Hypoxia tolerance of *Epinephelus fuscoguttatus*(♀) × *E. tukula*(♂) hybrids and *E. fuscoguttatus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2022, 29(2): 220-233. [段鹏飞, 田永胜, 李振通, 等. 棕点石斑鱼(♀)×蓝身大斑石斑鱼(♂)杂交后代与棕点石斑鱼低氧耐受能力初步研究[J]. 中国水产科学, 2022, 29(2): 220-233.]
- [13] Xiao J, Kang X W, Xie L H, et al. The fertility of the hybrid lineage derived from female *Megalobrama amblycephala*× male *Culter alburnus*[J]. Animal Reproduction Science, 2014, 151(1-2): 61-70.
- [14] West G. Methods of assessing ovarian development in fishes: A review[J]. Marine and Freshwater Research, 1990, 41(2): 199.
- [15] Zohar Y, Muñoz-Cueto J A, Elizur A, et al. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish[J]. General and Comparative Endocrinology, 2010, 165(3): 438-455.
- [16] Mandal B, Kailasam M, Bera A, et al. Gonadal recrudescence and annual reproductive hormone pattern of captive female spotted scats (*Scatophagus argus*)[J]. Animal Reproduction Science, 2020, 213: 106273.
- [17] Tenugu S, Pranoty A, Mamta S K, et al. Development and organisation of gonadal steroidogenesis in bony fishes-A review[J]. Aquaculture and Fisheries, 2021, 6(3): 223-246.
- [18] Sisneros J A, Forlano P M, Knapp R, et al. Seasonal variation of steroid hormone levels in an intertidal-nesting fish, the vocal plainfin midshipman[J]. General and Comparative Endocrinology, 2004, 136(1): 101-116.
- [19] Sehafii H H, Khodadadi M, Behbahani S A. Seasonal fluctuations of sex steroid hormones in indian major carp *Catla catla* in Khouzestan[J]. Journal of Environmental and Analytical Toxicology, 2014, 4(5): 1-5.
- [20] Ismail M F S, Siraj S S, Daud S K, et al. Association of annual hormonal profile with gonad maturity of mahseer (*Tor tambroides*) in captivity[J]. General and Comparative Endocrinology, 2011, 170(1): 125-130.
- [21] Zhao J L. Fish breeding[M]. 2nd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2017. [赵金良. 鱼类育种学[M]. 2版. 北京: 中国农业出版社, 2017.]
- [22] Ching F F, Othman N, Anuar A, et al. Natural spawning, embryonic and larval development of F₂ hybrid grouper, tiger grouper *Epinephelus fuscoguttatus*×giant grouper *E. lanceolatus*[J]. International Aquatic Research, 2018, 10(4): 391-402.
- [23] Liu Y, Zhou G J. Cytological study on the gonadal development of F₁ hybrid produced by crossing *Carassius auratus* L. (♀) with *Cyprinus carpio* (♂)[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1986, 10(2): 101-108+201-203. [刘筠, 周工健. 红鲫(♀)×湘江野鲤(♂)杂交一代生殖腺的细胞学研究[J]. 水

- 生生物学报, 1986, 10(2): 101-108+201-203.]
- [24] Ziomek E, Dębowska M, Hliwa P, et al. Impaired gonadal development in the sea trout (*Salmo trutta*)×Atlantic salmon (*Salmo salar*) F1 hybrid females[J]. Oceanological and Hydrobiological Studies, 2016, 45: 337-343.
- [25] Yoshikawa H, Xu D D, Ino Y, et al. Hybrid sterility in fish caused by mitotic arrest of primordial germ cells[J]. Genetics, 2018, 209(2): 507-521.
- [26] Hu W H, Dan C, Guo W J, et al. The morphology and gonad development of pelteobagrus fulvidraco and its interspecific hybrid “Huangyou no.1” with pelteobagrus vachelli[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2019, 43(6): 1231-1238. [胡伟华, 丹成, 郭稳杰, 等. 黄颡鱼和杂交黄颡鱼“黄优 1 号”形态及性腺发育的比较[J]. 水生生物学报, 2019, 43(6): 1231-1238.]
- [27] Muzaki A, Sembiring S B M, Permana G N, et al. The development of the reproductive organs of the hybrid grouper cantik (*Epinephelus fuscoguttatus*×*E. polyphkadion*)[J]. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2021, 890(1): 012016.
- [28] Li S S, Liu Q Y, Xiao L, et al. Comparison of gonadal development in diploid and triploid hybrid groupers, *Epinephelus coioides* ♀×*Epinephelus lanceolatus* ♂[J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2018, 49(2): 328-337.
- [29] Luin M, Fui C F, Senoo S. Sexual maturation and gonad development in tiger grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*) x giant grouper (*E. lanceolatus*) hybrid[J]. Journal of Aquaculture Research and Development, 2014, 5: 1-5.
- [30] Tian J. Backcross breeding between TGGG hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*×*E. lanceolatus*) and giant grouper (*E. lanceolatus*)[J]. Journal of Survey in Fisheries Sciences, 2021, 7(2): 49-62.
- [31] Li Z Q, Cheng M L, Wang L N, et al. Comparison of ploidy and gonad development between Yunlong grouper and moire grouper[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2021, 41(4): 134-141. [李子奇, 成美玲, 王林娜, 等. 云龙石斑鱼、云纹石斑鱼倍性及性腺发育比较[J]. 广东海洋大学学报, 2021, 41(4): 134-141.]
- [32] Zhong J, Ma L Y, Wang W M. Phenotypic traits and gonadal development of hybrids between *Misgurnus anguillicaudatus* and *Paramisgurnus dabryanus*[J]. Aquaculture, 2020, 523: 735129.
- [33] Wang J, Liu Q H, Shi Z Y. Analysis of growth and gonadal development in hybrids between *Perca flavescens* and *Perca schrenki*[J]. Freshwater Fisheries, 2009, 39(5): 7-12. [王佳, 刘青华, 施志仪. 黄金鲈与伊犁鲈杂交后代生长性能及杂交鲈性腺发育分析[J]. 淡水渔业, 2009, 39(5): 7-12.]
- [34] Lin G M, Gao D, Lu J G, et al. Transcriptome profiling reveals the sexual dimorphism of gene expression patterns during gonad differentiation in the half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. Marine Biotechnology, 2021, 23(1): 18-30.
- [35] Wu B, Zhang M Z, Deng S P, et al. Analysis of morphological index and discrimination of male and female *Scatophagus argus*[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2014, 23(1): 64-69. [吴波, 张敏智, 邓思平, 等. 金钱鱼雌雄个体的形态差异分析[J]. 上海海洋大学学报, 2014, 23(1): 64-69.]
- [36] da Silva Oliveira Zardin A M, de Oliveira C A L, de Oliveira S N, et al. Growth curves by Gompertz nonlinear regression model for male and female Nile tilapias from different genetic groups[J]. Aquaculture, 2019, 511: 734243.
- [37] Farley J H, Eveson J P, Davis T L O, et al. Demographic structure, sex ratio and growth rates of southern bluefin tuna (*Thunnus maccoyii*) on the spawning ground[J]. PLoS ONE, 2014, 9(5): e96392.
- [38] Olivas A P, Arredondo M S I, Sanchez X G M, et al. Reproductive biology of the leopard grouper *Mycteroperca rosacea* (Streets, 1877) in the coastal area of Santa Rosalia, BCS, Mexico[J]. Latin American Journal of Aquatic Research, 2018, 46(4): 699-708.
- [39] Zhang T, Zhang L Z, Zhao F, et al. The difference of plasma sex steroid levels and discriminant analysis of males and females in different ovarian developmental stages in cultured *Acipenser baerii*[J]. Marine Fisheries, 2008, 30(1): 19-25. [张涛, 章龙珍, 赵峰, 等. 西伯利亚鲟不同性别与卵巢发育时期血液性类固醇激素的差异与判别分析[J]. 海洋渔业, 2008, 30(1): 19-25.]
- [40] Rotili D A, Fornari D C, Zardo E L, et al. Sex steroid levels in females and males of *Brycon orbignyanus* throughout different juvenile and adult ages and during induction hormone in the mature females[J]. Aquaculture, 2022, 548: 737695.
- [41] Barannikova I A, Bayunova L V, Semenkova T B. Serum levels of testosterone, 11-ketotestosterone and oestradiol-17 beta in three species of sturgeon during gonadal development and final maturation induced by hormonal treatment[J]. Journal of Fish Biology, 2004, 64(5): 1330-1338.
- [42] Heidari B, Roozati S A, Yavari L. Changes in plasma levels of steroid hormones during oocyte development of caspian kutum (*Rutilus frisii kutum*, Kamensky, 1901)[J]. Animal Reproduction, 2010, 7(4): 373-381.
- [43] 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*)[J]. *Animal Reproduction Science*, 2007, 99(1-2): 156-166.
- [44] Alvarado M, Serrano E, Sánchez J C, et al. Changes in plasma steroid hormones and gonadal histology associated with sexual maturation in wild southern hake (*Merluccius australis*)[J]. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 2015, 43(4): 632-640.
- [45] Bhandari R K, Komuro H, Higa M, et al. Sex inversion of sexually immature honeycomb grouper (*Epinephelus merra*) by aromatase inhibitor[J]. *Zoological Science*, 2004, 21(3): 305-310.
- [46] Yaron Z, Levavi-Sivan B. Endocrine regulation of fish reproduction[J]. *Encyclopedia of Fish Physiology*, 2011, 15(1): 1500-1508.
- [47] Matsubara H, Lokman P M, Kazeto Y, et al. Serum steroid profiles in artificially maturing female Japanese eel, *Anguilla japonica*[J]. *Aquaculture*, 2005, 243(1-4): 393-402.
- [48] Idler D, Hwang S, Crim L, et al. Determination of sexual maturation stages of Atlantic salmon (*Salmo salar*) captured at sea[J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1981, 38: 405-413.
- [49] Sang H M, Lam H S, Hy L H K, et al. Changes in plasma and ovarian steroid hormone level in wild female blue tang fish *Paracanthurus hepatus* during a reproductive cycle[J]. *Animals: an Open Access Journal from MDPI*, 2019, 9(11): 889.
- [50] Kobayashi M, Aida K, Hanyu I. Involvement of steroid hormones in the preovulatory gonadotropin surge in female goldfish[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1989, 7(1): 141-146.
- [51] Patiño R, Sullivan C V. Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2002, 26(1): 57-70.
- [52] Poortenaar C W, Hooker S H, Sharp N. Assessment of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi lalandi*) reproductive physiology, as a basis for aquaculture development[J]. *Aquaculture*, 2001, 201(3-4): 271-286.

Comparative analysis of ovarian development and sex steroid hormone levels in hybrid Jinhu grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus tukula* ♂) and *Epinephelus fuscoguttatus*

QIU Yishu^{1,2}, DING Xiaoyu^{1,2}, LI Zhentong^{2,3}, DUAN Pengfei^{2,4}, WANG Xinyi^{2,4}, LI Linlin^{2,3}, WANG Linna^{2,3}, LIU Yang^{2,3}, MA Wenhui⁵, PANG Zunfang⁵, LI Shengzhong¹, TIAN Yongsheng^{2,3}

1. College of Life Science, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China;
2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;
3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071, China;
4. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
5. Ming Bo Aquatic Co. Ltd., Laizhou 261400, China

Abstract: Grouper is an important economic fish both in China and internationally. It is characterized by its delicious meat, high nutritional value, ease of consumption, and high breeding efficiency. Currently, grouper germplasm resources in natural marine areas are seriously degraded, and the number of seedlings has been seriously insufficient. Hybridization is a widely used breeding method that not only enriches the genetic structure, combines different types of superior traits of the parents, and increases the viability of the hybrid offspring, but also produces superior traits not present in the parents to obtain heterosis. We obtained the Jinhu grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus tukula* ♂), which has a high fertilization rate, high hatching rate, low malformation rate, and rapid growth through cross-breeding experiments using the frozen sperm of *E. tukula* and *E.*

fuscoguttatus. In the present study, the hybrid Jinhu grouper and the maternal *E. fuscoguttatus* were used to study ovarian development and serum steroid hormone levels. Jinhu groupers and *E. fuscoguttatus* aged 10, 18, 24, and 36 months were anesthetized with MS-222, and blood was collected through the caudal vein. The blood was placed in a refrigerator at 4 °C overnight, centrifuged at 3500 g for 5 min, and the supernatant was snap-frozen in liquid nitrogen and then stored in a refrigerator at -80 °C. Jinhu groupers and *E. fuscoguttatus* were dissected; gonads were removed, fixed in Bouin's fixative solution, and transferred to 70% ethanol for preservation. Paraffin sections of gonadal tissues were created to observe the ovarian development. Serum estradiol (E2), 11-keto testosterone (11-KT), testosterone (T), and progesterone (P) levels were measured via enzyme-linked immunosorbent assays. The results showed that the ovaries of Jinhu grouper developed normally without oocyte atrophy or degeneration. The ovaries of 36-month-old Jinhu grouper developed to the early stage III, and the volume of oocytes increased significantly, and the nucleoli were mostly located on the outside of the nuclear membrane. The ovaries of *E. fuscoguttatus* developed rapidly, reaching the end of stage III at 36 months of age, when the volume of oocytes increased further. Another layer of follicular membrane formed outside the egg membrane to form a double-layer follicular membrane structure. The serum levels of E2, 11-KT, and P in Jinhu groupers and *E. fuscoguttatus* were similar, showing a trend of first increasing and then decreasing, and reaching the maximum at 24 months of age. The serum T level in Jinhu groupers was consistent with the changes in the other sex steroid hormones: It reached a maximum at 24 months of age and significantly decreased at 36 months of age, whereas the serum T level in *E. fuscoguttatus* remained at the same high level at both 36 and 24 months of age. The serum levels of E2, T, and P in *E. fuscoguttatus* were significantly higher than those in Jinhu grouper at 24 months of age ($P < 0.05$). The results showed that the ovaries of Jinhu groupers developed normally but slower than those of the parent *E. fuscoguttatus*. The serum E2, 11-KT, P, and T levels of Jinhu groupers were lower or significantly lower than those of *E. fuscoguttatus* at each development stage. These results indicated that the sexual maturity level of Jinhu grouper was significantly lower than that of maternal *E. fuscoguttatus*, providing a cellular and serological basis for the study of gonadal development and fertility of hybrid grouper.

Key words: Jinhu grouper; *Epinephelus fuscoguttatus*; hybridization; ovarian development; sex steroid hormone

Corresponding author: TIAN Yongsheng. E-mail: tianys@ysfri.ac.cn; LI Shengzhong. E-mail: xndlishengzhong@sina.cn