

文章编号: 1674-5566(2013)06-0841-08

HCG 与 LHRHa 对雌性蜂巢石斑鱼产卵期间生理变化的影响及比较

左永松^{1,2}, 仲地政人², 中村将³, 征矢野清², 陈再忠¹, 钟俊生¹

(1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306; 2. 长崎大学环中国东海资源环境研究所, 日本长崎县 851-2213; 3. 琉球大学热带生物圈研究所, 日本冲绳县 903-0213)

摘要: 选取日本冲绳地区雌性蜂巢石斑鱼为对象, 描述与分析了 HCG 与 LHRHa 对该鱼催产效果的差异及注射后所引起的性腺发育变化和排卵相关的性类固醇变化, 希望能为蜂巢石斑鱼的人工繁殖提供可靠的理论基础, 以及在实践生产中的重要参考。结果表明, HCG 与 LHRHa 均显著促进了决定排卵的性成熟诱导物质 MIS 的释放以及鱼的产卵; 产卵后的蜂巢石斑鱼雌二酮 E₂ 的水平显著下降, 验证了蜂巢石斑鱼卵巢发育及产卵随月亮周期变化的周期性; 在渔业生产中注射催产药物前, 确定对象鱼卵泡发育阶段对于提高催产成功率十分重要。在 LHRHa 注射组, 完成卵黄化的蜂巢石斑鱼催产效果最佳, 卵黄化早期的鱼不产卵; HCG 对卵泡发育初期的蜂巢石斑鱼的催产效果优于 LHRHa, 但催产效果仍不理想, 而对于完成了卵黄化鱼的催产效果不如 LHRHa。结合 LHRHa 的其他优势, 本研究认为在具备检验鱼体卵巢发育阶段实验技术的条件下, 更加推荐 LHRHa 作为雌性蜂巢石斑鱼的催产药物。

研究亮点: 首次对催产蜂巢石斑鱼繁殖产卵期间的生理性状及其卵巢发育关键激素雌二醇与诱发排卵关键激素 17 α -20 β -双羟孕酮 DHP 和 17 α -20 β -21-三羟孕酮 20 β -S 的变化进行了研究, 并阐述了 HCG 和 LHRHa 对鱼生理状况的影响, 指出在注射 HCG 与 LHRHa 前对蜂巢石斑鱼进行性腺发育进行检验的重要性, 并比较了 LHRHa 相对于 HCG 催产的优势。

关键词: 蜂巢石斑鱼; 绒毛膜促性腺激素; 促黄体激素释放激素类似物; 雌二醇; 性成熟诱导物质

中图分类号: Q 492.5; S 917

文献标志码: A

蜂巢石斑鱼 (*Epinephelus merra*) 是一种小型石斑鱼, 属于暖水性底层鱼类, 主要生活在热带印度洋和太平洋浅水海域, 在中国南海、澎湖列岛等海域均有其分布^[1-2]。目前, 以蜂巢石斑鱼为实验对象的研究在国内仅有郑莲等关于其随机扩增多态性 DNA 的初步研究^[3], 侧重点也主要是在于对 RAPD 技术应用的拓展。在国外, 主要是日韩研究者从事蜂巢石斑鱼的研究, 其中 ALAM 等^[4-6]、BHANDARI 等^[7] 和 SOYANO 等^[8] 就蜂巢石斑鱼在繁殖季节的生理生态特性进行了一定的研究, 分别在各自关注的领域阐述了蜂巢石斑鱼随月周期变化产卵的规律性及性逆转机制, 间接地说明了一些重要的生理激素 (如芳香化酶抑制剂、卵泡刺激素等) 对蜂巢石斑鱼

繁殖的影响。但是, 其重心主要放在其产卵期的生态特征或这些药物对其性逆转产生的效应上, 对于雌性蜂巢石斑鱼的繁殖性状和性类固醇变化的描述较为不足。

鱼类人工催产激素经历了长时间的发展和实践过程, 其中绒毛膜促性腺激素 HCG (Human chorionic gonadotrophin)、促黄体激素释放激素类似物 LHRHa (Luteinizing Hormone-Releasing Hormone analogue (des-Gly10, [D-Ala6] LH-RH Ethylamide)) 在当前水产养殖中的应用非常频繁^[9-10], 且其效果也由于其影响脑-垂体-性腺轴通路的位置和机理不同, 具有不同的优势与不足^[11]。因此, 本研究就这两种人工催产药物对雌性蜂巢石斑鱼催产效果的不同及所引起的性腺

收稿日期: 2013-04-25 修回日期: 2013-05-26

基金项目: 上海市重点学科水生生物学建设项目 (S0701)

作者简介: 左永松 (1987—), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产养殖学。E-mail: left.forever.pain@gmail.com

通信作者: 钟俊生, E-mail: jszhong@shou.edu.cn

发育和排卵相关的性类固醇变化的生理过程进行了阐述,希望能为蜂巢石斑鱼的催产过程提供可靠的鱼类生理理论基础及其在实践生产操作中应用的重要参考。

1 材料与方法

1.1 实验对象及其采样

所有的实验蜂巢石斑鱼均由本实验组成员与日本冲绳县瀬底岛的当地渔民在该鱼繁殖季节采自瀬底岛周边岛屿,从所有渔获的个体中挑选出大小符合要求,体质状况良好,具有繁殖性征的雌性蜂巢石斑鱼置于循环海水养殖系统中,在自然光照和水温的条件暂养一周左右后,进行随后的研究。本研究选取的采样时间为蜂巢石斑鱼最佳的繁殖季节6月和7月^[12],在2011年与2012年,分别在满月前2周左右对瀬底岛周边珊瑚礁地带海域进行了4次浮潜垂钓,4次采样所得用作本研究的实验鱼依次为19尾(平均体长 199.4 ± 24.1 mm,平均体重 115.3 ± 33.5 g),29尾(平均体长 203.8 ± 29.0 mm,平均体重 119.9 ± 30.5 g),15尾(平均体长 199.1 ± 30.3 mm,平均体重 119.9 ± 20.3 g)和67尾(平均体长 180.9 ± 31.1 mm,平均体重 77.7 ± 22.0 g)。所有实验鱼在注射实验部分完成后均进行血液的采取,之后对鱼体解剖并取下性腺用于组织学观察。

1.2 催产药物的注射

催产药物 HCG 和 LHRHa 的注射时间为满月前一日^[8],使用剂量参考了 SELMAN, CHOURASIA, CHATAKONDI 等人的报道^[13-15]及本实验室以往的实践经验。分别按照 HCG 500 IU, LHRHa 50 μ g 每 1 kg 鱼体重的剂量溶解于鱼类生理盐水(piscine saline)中,使用 1 mL 注射器在蜂巢石斑鱼背部侧线上方 3 ~ 5cm 处进行注射。按照注射药物及方式的不同可划分为,初始对照组(不注射任何药物,注射当日取样),对照组(注射等剂量鱼类生理盐水),HCG 注射组,LHRHa 注射组。其中,HCG 注射组与 LHRHa 注射组及相应对照组组内根据卵细胞发育期的不同在注射前再细分为发育早期的 Pn(perinucleolus stage)核仁外期或 Yv(yolk vesicle stage)卵黄囊期的 Pn V Yv 组,以及三级卵黄期的 Ty(Tertiary yolk stage)组两个平行组。

1.3 卵巢的组织学观察

所有实验鱼除初始对照组注射前取样外,都在产卵期结束后(满月后 4 ~ 5 日)当日处死,并取其卵巢进行组织学观察,此外在注射后第 1 日和第 3 日都使用卵细胞抽取器从泄殖孔对对照组、HCG 组和 LHRHa 组的实验鱼提取少量的卵细胞用于检测该时间段鱼体卵细胞发育情况。所取的卵细胞样本均在采集后立即置于波恩试液中固定 24 h 后于 70% 乙醇中保存直至进行组织学观察。包埋采用石蜡载体,切片厚度 5 μ m,染色方式为 HE 染色,染色完成后在光学显微镜下镜检。卵细胞不同发育阶段的分期根据 LEE 等^[12]和 SHEIN 等^[16]的方法进行划分。

1.4 雌二醇的检测

本研究使用取样所得的血液样品经过低温离心提取血清后置于 -40 $^{\circ}$ C 过夜后于 -80 $^{\circ}$ C 下冷藏直至开始检测。所有血清样品首先经过低温甲醇-乙醚冷冻蒸发系统^[17-18]进行类固醇的再提纯,经过 3 次冷冻蒸发后的血清样品在稀释后用于雌二醇的检测。雌二醇的检测采用从 Cayman Chemical Company 生物公司购置的 EIA (Enzyme Immunoassay) 酶免疫试剂盒进行定量测量。

1.5 性成熟诱导物质 MIS 的检测

同样使用采得的蜂巢石斑鱼血清样本进行此检测,再提纯的方法如 1.4 所述,得到提纯并稀释后的血清样本后,使用 ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) 酶联免疫吸附测定法^[19]进行检测,蜂巢石斑鱼用的性成熟诱导物质 DHP (17, 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one) 和 20 β -S (17, 20 β , 21 trihydroxy-4-pregnen-3-one) 标准物来自日本琉球大学抗原抗体资源库。

1.6 数据处理

所有实验数据均由 Excel 2010 或 SPSS 19.0 进行处理或采用单因素方差分析检测显著性。各实验效应因子间对实验数据产生交互影响用 SPSS 19.0 中的单因变量多因素方差分析法 (Univariate Analysis of Variance) 进行分析。

2 结果

2.1 产卵情况及卵巢的组织学观察

在 2011、2012 两年间的蜂巢石斑鱼繁殖季节里,未经注射 HCG 或者 LHRHa 的初始对照组以

及仅注射生理盐水的对照组的鱼均没有观测到产卵现象,总计 43 尾鱼的 HCG 注射实验组中,共有 23 尾观察到产卵,LHRHa 组总计 25 尾鱼中,共有 10 尾观察到产卵现象。如图 1 所示,对于注射前卵细胞主要处于 Pn ∨ Yv 期的实验个体,仅有 HCG 注射组能诱使雌性蜂巢石斑鱼产卵(3/13);而 Ty 期的鱼体,催产激素 HCG 及 LHRHa 的注射均能诱导产卵(HCG:20/27; LHRHa:10/12)。进行配对样本 T 检验发现,当雌性蜂巢石斑鱼大部分卵细胞处于 Ty 期时,注射了 HCG 与 LHRHa 的实验鱼产卵个体数显著多于 Pn ∨ Yv 期的个体($P < 0.05$);Ty 期 LHRHa 组产卵频率 83%,略高于 HCG 组的 67%。

根据石蜡组织切片的观察结果,所有处理组均观测到了如图 2 中的卵巢发育期卵泡,其中 4 图中的生发泡破裂 GVBD (Germinal Vesicle Breakdown) 仅在 LHRHa 与 HCG 注射组的个体中观测到。初始对照组 25 尾实验鱼中,处在 Pn ∨ Yv 期的实验鱼有 23 尾,Ty 期 2 尾;对照组 37 尾鱼中 Pn ∨ Yv 期有 20 尾,Ty 期 17 尾。HCG 注射

组 43 尾鱼中 Pn ∨ Yv 期 16 尾,Ty 期 27 尾,产卵尾数 23 尾;LHRHa 注射组 25 尾鱼中有 Pn ∨ Yv 期 13 尾,Ty 期 12 尾,产卵尾数 10 尾。

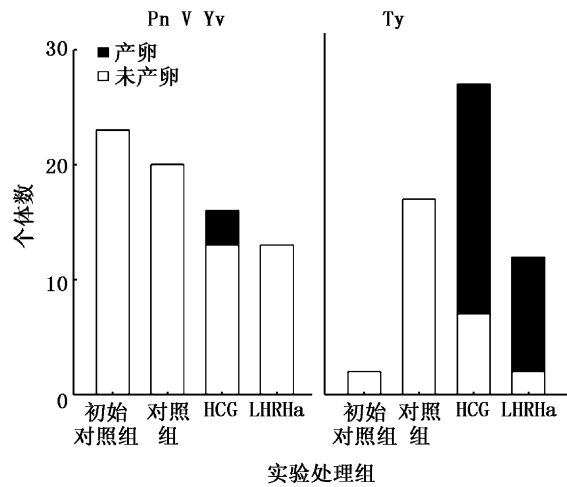


图 1 不同卵细胞发育阶段下各实验处理组产卵情况
Fig. 1 Ovulation status of each experimental treatment group in different oocyte development stage

Pn ∨ Yv. 卵细胞以核仁外期 perinucleolus stage 或卵黄囊期 yolk vesicle stage 为主;Ty. 卵细胞以三级卵黄期 tertiary yolk stage 为主。

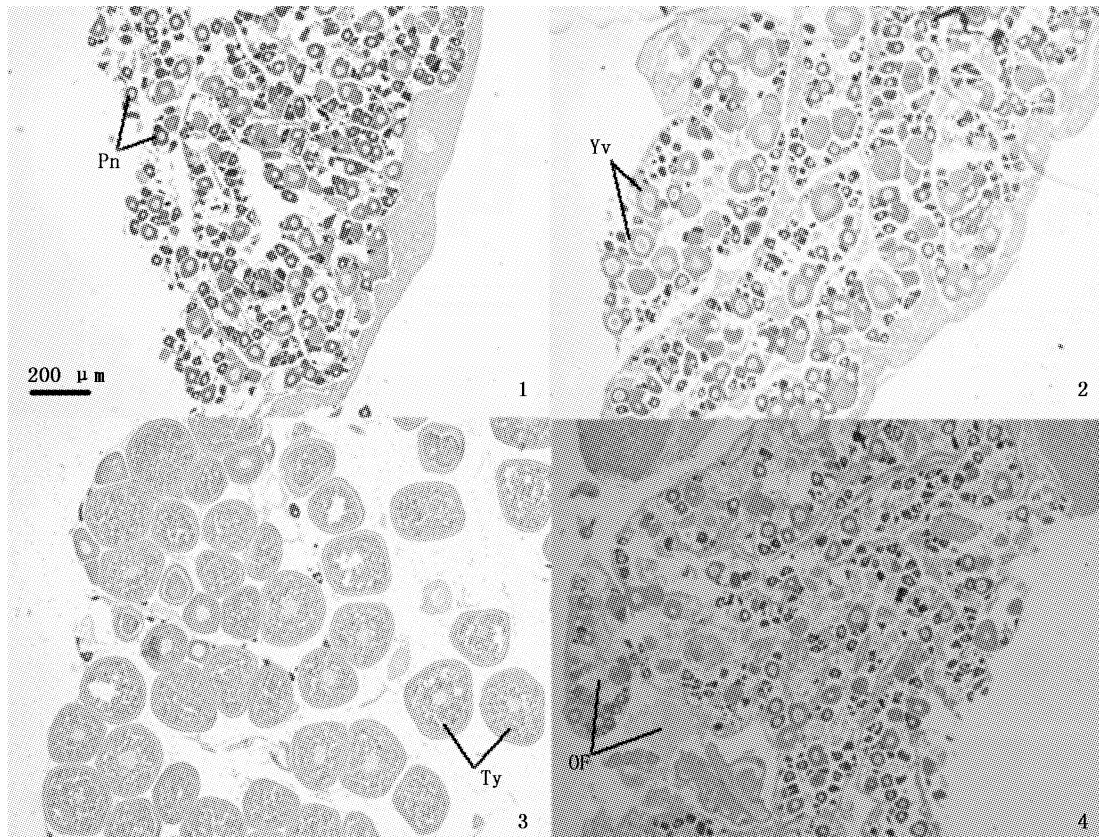


图 2 不同发育阶段雌性蜂巢石斑鱼的 HE 染色石蜡组织切片

Fig. 2 Ovary sections stained with HE of female honeycomb grouper

Pn. 核仁外期; Yv. 卵黄囊期; Ty. 3 级卵泡期; OF. 已排卵卵泡。

2.2 雌二醇与性成熟诱导物质 MIS 检测结果

如图3所示,注射催产药物 HCG 或 LHRHa 的雌性蜂巢石斑鱼与对照组及初始对照组相比,总体上雌二醇的值有显著下降($P < 0.05$);注射不同催产激素的实验个体血清中的雌二醇值在 Pn V Yv 期均没有显著性差异($P > 0.05$),而在 Ty 期与初始对照组及对照组相比有显著性下降($P < 0.05$),对照组与初始对照组相比,雌二醇也显著下降($P < 0.05$);无论产卵与否,经过 HCG 或 LHRHa 注射处理过的实验鱼与初始对照组相比雌二醇均有显著下降($P < 0.05$),但对于未产卵实验鱼,初始对照组与对照组、对照组与各催产药物注射组、各催产药物注射组之间雌二醇的值均没有显著性差异($P > 0.05$)。对各组的雌二醇值进行单因变量多因素方差分析(Univariate Analysis of Variance)(表1)发现,卵巢发育阶段条件为主效应因子时对雌二醇的值影响不显著($P > 0.05$);产卵状况或不同催产药物注射作为主效应因子对雌二醇的值影响显著($P < 0.05$);交互效应因子——卵巢发育阶段 × 产卵状况、卵巢发育阶段 × 不同催产药物注射、产卵状况 × 不同催产药物注射对雌二醇的值影响均不显著($P > 0.05$)。

对于性成熟诱导物质 MIS,如图3所示,注射催产药物 HCG 或 LHRHa 的雌性蜂巢石斑鱼与对照组及初始对照组相比,总体上 DHP 的值均显著上升($P < 0.05$);注射不同催产激素的实验个体血清中的 DHP 值在 Pn V Yv 期与对照组及初始对照组相比,DHP 的值均有显著上升($P < 0.05$);不同注射组实验鱼血清中的 DHP 在 Ty 期与初始对照组相比都有显著性差异($P < 0.05$),LHRHa 注射组 DHP 值显著高于对照组及初始对照组($P < 0.05$),LHRHa 组与 HCG 组、HCG 注射组与对照组、对照组与初始对照组之间 DHP 值均无差异($P > 0.05$);无论产卵与否,HCG 注射组与 LHRHa 注射组的实验鱼与初始对照组相比 DHP 值均有显著上升($P < 0.05$),LHRHa 注射组的 DHP 值均显著高于 HCG 组($P < 0.05$);对于未产卵实验鱼,对照组与初始对照组、HCG 组与对照组之间 DHP 值没有显著差异($P > 0.05$),但 LHRHa 组显著高于对照组($P < 0.05$)。表1表明,卵巢发育阶段为主效应因子时对 DHP 的值影响不显著($P > 0.05$);产卵状况或不同催产药物

注射为主效应因子时对 DHP 值影响显著($P < 0.05$);交互效应因子——卵巢发育阶段产卵状况 × 产卵状况、卵巢发育阶段 × 不同催产药物注射、产卵状况 × 不同催产药物注射对 DHP 值的影响均不显著($P > 0.05$)。

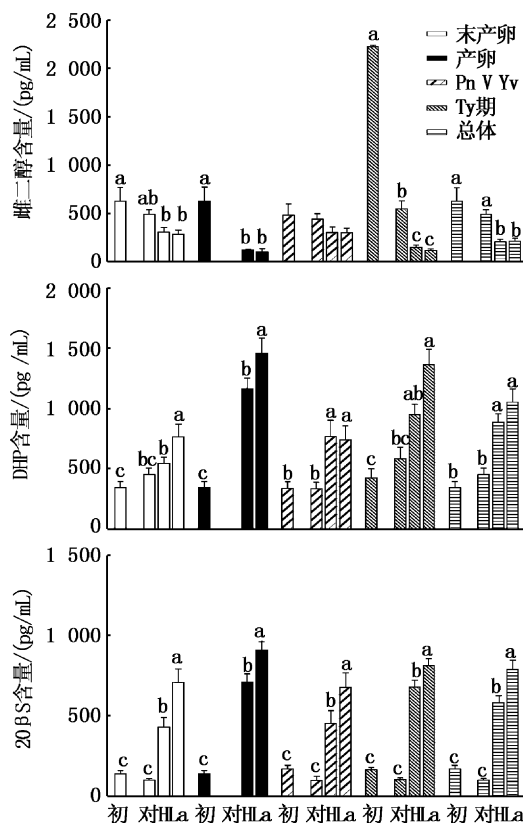


图3 实验因子对血清中雌二醇,DHP及 $20\beta S$ 的影响与比较

Fig.3 Impacts and comparison of experimental factors on E_2 , DHP and $20\beta S$ in serum

图中“初”表示初始对照组,“对”表示空白对照组,“H”表示 HCG 注射组,“La”表示 LHRHa 注射组;由于初始对照组和空白对照组中无实验鱼产卵,上图各产卵组别的初始对照组 initial 项的数值是为了便于比较来自于未产卵组的值;各图案显著性标记相互独立,误差条:平均标准误差 SEM。

对于注射前处在 Pn V Yv 期和 Ty 期卵巢发育阶段的所有实验鱼,无论产卵与否,注射催产药物 HCG 或 LHRHa 的雌性蜂巢石斑鱼与对照组及初始对照组相比, $20\beta S$ 的值均显著上升($P < 0.05$),LHRHa 注射组的实验鱼 $20\beta S$ 值均显著高于 HCG 组($P < 0.05$),初始对照组与对照组之间 $20\beta S$ 值均没有显著性差异($P > 0.05$)。对各组的 $20\beta S$ 值使用单因变量多因素方差分析进行进一步分析发现,卵巢发育阶段为主效应因子时

对 20β -S 的值影响不显著 ($P > 0.05$); 产卵状况或不同催产药物注射为主效应因子时对 20β -S 值影响显著 ($P < 0.05$); 交互效应卵巢发育阶段 \times 产卵状况为主效应因子时对 20β -S 值的影响不显著 ($P > 0.05$); 产卵状况 \times 不同催产药物注射、卵巢发育阶段 \times 不同催产药物为注射主交互效应因子时对 20β -S 值均有显著的影响 ($P < 0.05$)。

表 1 各效应因子对不同激素影响的单因变量多因素方差分析

Tab. 1 Univariate analysis of variant factors on different steroids

效应因子	不同激素		
	E ₂	DHP	20 β -S
卵巢发育阶段	-	-	-
产卵状况	○	○	○
不同催产药物注射	○	○	○
卵巢发育阶段 * 不同催产药物注射	-	-	-
卵巢发育阶段 * 产卵状况	-	-	○
产卵状况 * 不同催产药物	-	-	○

注: ○表示差异显著; -表示差异不显著。

3 讨论

根据 LEE, SOYANO 等^[8, 12]的报道, 在自然条件下, 蜂巢石斑鱼的卵黄生成开始于 5 月, 在 6 月份达到峰值, 持续到 9 月, 产卵期在满月到最后 1/4 月相之间。本研究在实验月份满月后 3 至 5 日均观测到了其产卵现象, 并通过组织学石蜡切片确认了产卵个体及尾数, 研究结果发现, 与天然海水连通的人工养殖池中暂养的蜂巢石斑鱼在未注射催产药物的情况下, 有相当数量的初始对照组与对照组个体的卵泡虽然完成了卵黄化但是在繁殖期结束后均没有观测到产卵, 而在人工催产药物 HCG 与 LHRHa 的注射条件下, 则分别有占该处理组总数的 50% 和 40% 的实验鱼完成排卵过程。SOYANO, NAKAMURA 等^[8, 20]在其研究中指出, 尽管自然条件下蜂巢石斑鱼的卵泡可以在近海珊瑚礁区域发育成熟, 但是在繁殖期, 仍需要游出大陆架至深海区才能完成其产卵行为, 这支持了本研究结果的观点, 即与大多数硬骨鱼类一样^[11, 13, 21], 催产药物 HCG 与 LHRHa 均能有效地促进雌性蜂巢石斑鱼的产卵。需要注意的是, 在注射前观察到卵泡处于 Pn V Yv 期的 LHRHa 注射组中没有实验鱼产卵, HCG 注射组产卵频率也仅为 23%, 而 Ty 期的实验鱼在

HCG 注射组和 LHRHa 注射组中产卵频率分别达到了 67% 和 83%, 同时, 决定排卵的性成熟诱导物质 MIS 的检测结果也同样表明注射了 HCG 或者 LHRHa 后, 诱导产卵的 DHP 与 20β -S 的释放均大幅增多, 对于未能产卵的鱼类可能是由于卵泡尚未发育成熟, 导致未能被成功诱使排卵^[9, 22], 在其他硬骨鱼类中, 比如亚洲鲶 (*Pangasius hypophthalmus*)^[23], 里海褐鲟 (*Salmo trutta caspius*)^[21], 黑带石斑鱼 (*Epinephelus marginatus*)^[24], 海鲤 (*Sparus aurata*)^[25], 黑海鲈 (*Centropristis striata*)^[15, 26] 等也有类似结论的发表, 认为催产药物 HCG 或 LHRHa 对于卵泡处在卵黄化晚期的个体的效用最为显著。由此可见在蜂巢石斑鱼渔业生产过程中, 在注射这两种催产药物前确定其卵泡发育阶段对于提高催产成功率十分重要。

虽然与某些鱼类相比^[27-28], HCG 对于促进处在 Pn V Yv 期卵泡产卵的效率不高, 但由于本研究中 LHRHa 注射组的实验鱼没有观测到产卵个体, 排除样本容量大小的因素, 故本研究认为 HCG 对卵泡发育初期的蜂巢石斑鱼的催产效果应优于 LHRHa。无独有偶, 在对太平洋鲱 (*Clupea harengus pallasii*)^[29]、香鱼 (*Plecoglossus altivelis*)^[30]、美洲拟鲈 (*Pleuronectes americanus*)^[31] 等鱼在卵黄化早期进行 LHRHa 处理, 均不能诱使其产卵, 所以很多研究者认为 LHRHa 对卵黄化早期的多数鱼类催产作用不佳。然而, 从产卵率和诱发排卵关键激素 DHP 与 20β -S 的统计数据结果均可以看出 LHRHa 对卵泡处于 Ty 期的蜂巢石斑鱼的催产效果更好, 考虑到 LHRHa 与 HCG 相比, 其具有使用剂量更低、生物安全性更高、适用物种范围更广、可对同一条鱼多次使用而不会引起鱼体的免疫反应从而获得更长久的效用时间等特点, LHRHa 在水产养殖的实践中更具有优势和潜力^[11]。因此, 在具备检验鱼体卵巢发育阶段技术的条件下, 更加推荐 LHRHa 作为雌性蜂巢石斑鱼的催产药品。

雌二醇作为影响卵泡发育的主要因素之一, 对雌鱼的性腺发育起着关键性的作用, 大量研究资料表明, 在硬骨鱼类中, 雌二醇通常在卵黄化发生晚期和产卵前达到峰值, 随后显著下降^[32-39], 对比图 3 可以看出, 本实验结果符合这项规律, 初始对照组 Ty 期末产卵个体的雌二醇

值对应着峰值,且产卵个体血清中的雌二醇值远低于未产卵个体,与用规律推论出此时实验鱼应处于卵黄化发生晚期和产卵前阶段的结论相同,从而进一步应用此结论可从蛋白水平验证蜂巢石斑鱼的伴随月亮周期产卵的特性。

根据表 1 中统计学数据的结果可以看出,使用不同催产药物来处理实验鱼,在卵巢发育阶段及产卵状况相同的条件下,对雌二醇、DHP 和 20β -S 的释放量有显著的影响(雌二醇下降,DHP 和 20β -S 增加),从统计学上说明了催产药物在蜂巢石斑鱼繁殖产卵期间在激素水平上对其产生的显著作用,正是由于这些激素释放的显著差异反馈到随后的生理变化上,造成了蜂巢石斑鱼之间卵巢发育和产卵状况的不同。由此可见催产药物 HCG 和 LHRHa 对于雌性蜂巢石斑鱼在产卵期间的卵巢发育、排卵等生理变化产生的重大影响。

参考文献:

- [1] 陈国宝,李永振. 南海主要珊瑚礁科鱼类的组成与分布[J]. 南方水产, 2005(3):18-25.
- [2] 雷从改,尹绍武,陈国华. 石斑鱼繁殖生物学和人工繁殖技术研究现状[J]. 海南大学学报:自然科学版, 2005(3):288-292.
- [3] 郑莲,刘楚吾. 蜂巢石斑鱼随机扩增多态性 DNA 的初步研究[J]. 湛江海洋大学学报, 2002(4):14-18.
- [4] ALAM M A, BHANDARI R K, KOBAYASHI Y. Changes in androgen-producing cell size and circulating 11-ketotestosterone level during female-male sex change of honeycomb grouper *Epinephelus merra* [J]. Molecular Reproduction and Development, 2006, 73 (2):206-14.
- [5] ALAM M A, BHANDARI R K, KOBAYASHI Y. Induction of sex change within two full moons during breeding season and spawning in grouper[J]. Aquaculture, 2006, 255 (1/4):532-535.
- [6] ALAM M A, KOBAYASHI Y, HIRAI T. Isolation, characterization and expression analyses of FSH receptor in protogynous grouper [J]. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2010, 156 (3):364-71.
- [7] BHANDARI R K, HIGA M, NAKAMURA S. Aromatase inhibitor induces complete sex change in the protogynous honeycomb grouper (*Epinephelus merra*) [J]. Molecular Reproduction and Development, 2004, 67 (3):303-307.
- [8] SOYANO K, MASUMOTO T, TANAKA H. Lunar-related spawning in honeycomb grouper, *Epinephelus merra*[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2003, 28 (1/4):447-448.
- [9] ZOHAR Y, MUNOZ-CUETO J A, ELIZUR A. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish[J]. General and Comparative Endocrinology, 2010, 165 (3):438-455.
- [10] 许星鸿. 催产剂在鱼类人工繁殖中的应用[J]. 渔业致富指南, 2000(7):12.
- [11] GUZMAN J M, RAMOS J, MYLONAS C C. Comparative effects of human chorionic gonadotropin (HCG) and gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRHa) treatments on the stimulation of male Senegalese sole (*Solea senegalensis*) reproduction[J]. Aquaculture, 2011, 316 (1/4):121-128.
- [12] LEE Y D, PARK S H, TAKEMURA A. Histological observations of seasonal reproductive and lunar-related spawning cycles in the female honeycomb grouper *Epinephelus merra* in Okinawan waters[J]. Fisheries Science, 2002, 68 (4):872-877.
- [13] CHATAKONDI N G, YANT D R, KRISTANTO A. The effect of luteinizing hormone releasing hormone analog regime and stage of oocyte maturity for induced ovulation of channel catfish, *Ictalurus punctatus* [J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2011, 42 (6):845-853.
- [14] CHOURASIA T K, JOY K P. Estrogen-2/4-hydroxylase activity is stimulated during germinal vesicle breakdown induced by HCG, IGF-1, GH and insulin in the catfish *heteropneustes fossilis* [J]. General and Comparative Endocrinology, 2008, 155 (2):413-421.
- [15] CERDA J, SELMAN K, HSIAO S M. Evidence for the differential regulation of ovarian follicle responsiveness to human chorionic gonadotropin in vitro in a serranid teleost, *Centropomus striata* [J]. Aquaculture, 1997, 159 (1/2):143-157.
- [16] SHEIN N L, CHUDA H, ARAKAWA T. Ovarian development and final oocyte maturation in cultured sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus*[J]. Fisheries Science, 2004, 70 (3):360-365.
- [17] SIGRIST H, SIGRIST-NELSON K, GITLER C. Single-phase butanol extraction: A new tool for proteolipid isolation[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1977, 74 (1):178-184.
- [18] SHAH V K G, DUNSTAN H, TAYLOR W. An efficient diethyl ether-based soxhlet protocol to quantify faecal sterols from catchment waters[J]. Journal of Chromatography A, 2006, 1108 (1):111-115.
- [19] AVRAMEAS S, TERNYNCK T. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) [M]. Elsevier, 1998:816-819.
- [20] NAKAMURA M, KOBAYASHI Y, MIURA S. Sex change in coral reef fish[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2005, 31 (2/3):117-122.
- [21] NOORI A, AMIRI B M, MIRVAGHEFI A. LHRHa-induced ovulation of the endangered-Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*) and its effect on egg quality and two sex steroids: testosterone and 17α -hydroxyprogesterone [J]. Aquaculture Research, 2010, 41 (6):871-877.
- [22] YARON Z, LEVAVI-SIVAN B. Hormonal control of repro-

- duction and growth Endocrine Regulation of Fish Reproduction[M]. Academic Press, 2011: 1500 - 1508.
- [23] LEGENDRE M, SLEMBROUCK J, SUBAGJA J. Ovulation rate, latency period and ova viability after GnRH- or HCG-induced breeding in the Asian catfish *Pangasius hypophthalmus* (Siluriformes, Pangasiidae) [J]. Aquatic Living Resources, 2000, 13 (3): 145 - 151.
- [24] SARTER K, PAPADAKI M, ZANUY S. Permanent sex inversion in 1-year-old juveniles of the protogynous dusky grouper (*Epinephelus marginatus*) using controlled-release 17α -methyltestosterone implants [J]. Aquaculture, 2006, 256 (1/4): 443 - 456.
- [25] WONG T T, ZOHAR Y. Novel expression of gonadotropin subunit genes in oocytes of the gilthead seabream (*Sparus aurata*) [J]. Endocrinology, 2004, 145 (11): 5210 - 5220.
- [26] BERLINSKY D L, KING W V, SMITH T I J. The use of luteinizing hormone releasing hormone analogue for ovulation induction in black sea bass (*Centropristis striata*) [J]. Aquaculture, 2005, 250 (3/4): 813 - 822.
- [27] PATINO R, BOLAMBA D, THOMAS P. Effects of external pH on hormonally regulated ovarian follicle maturation and ovulation in Atlantic croaker [J]. General & Comparative Endocrinology, 2005, 141 (2): 126 - 134.
- [28] HADDY J A, PANKHURST N W. The efficacy of exogenous hormones in stimulating changes in plasma steroids and ovulation in wild black bream *Acanthopagrus butcheri* is improved by treatment at capture [J]. Aquaculture, 2000, 191 (4): 351 - 366.
- [29] CAROLSFELD J, SHERWOOD N, KREIBERG H. Induced sexual maturation of herring using GnRH 'quick-release' cholesterol pellets [J]. Aquaculture, 1988, 70: 169 - 181.
- [30] CHANG C F, HU H J, TANG H C. Stimulation of ovulation in ayu, *Plecoglossus altivelis*, by treatment with antiestrogens and luteinizing hormone-releasing hormone analog [J]. Aquaculture, 1992, 101 (3/4): 329 - 336.
- [31] HARMIN S A, CRIM L W. Influence of gonadotropic hormone-releasing hormone analog [GnRH-A] on plasma sex steroid profiles and milt production in male winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus* [J]. Fish Physiology & Biochemistry, 1993, 10 (5): 399 - 407.
- [32] CLELLAND E, PENG C. Endocrine/paracrine control of zebrafish ovarian development [J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2009, 312 (1/2): 42 - 52.
- [33] MANANOS E L, ZANUY S, CARRILLO M. Photoperiodic manipulations of the reproductive cycle of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and their effects on gonadal development, and plasma 17β -estradiol and vitellogenin levels [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 1997, 16 (3): 211 - 222.
- [34] MATSUYAMA M, ADACHI S, NAGAHAMA Y. Diurnal rhythm of serum steroid hormone levels in the Japanese whiting, *Sillago japonica*, a daily-spawning teleost [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 1990, 8 (4): 329 - 338.
- [35] YARON Z, LEVAVI-ZERMONSKY B. Fluctuations in gonadotropin and ovarian steroids during the annual cycle and spawning of the common carp [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 1986, 2 (1/4): 75 - 86.
- [36] ITO F, YAMASAKI T, YAMAGUCHI M. Influence of the spawning environment on final maturation and spawning in Japanese dace, *Tribolodon hakonensis* [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2003, 28 (1/4): 417 - 418.
- [37] TAKANO K, TAKEMURA A, FURIHATA M. Annual reproductive and spawning cycles of female *Sebastes marmoratus* [J]. Environmental Biology of Fishes, 1991, 30 (1/2): 39 - 48.
- [38] KOBAYASHI M, SORENSEN P, STACEY N. Hormonal and pheromonal control of spawning behavior in the goldfish [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2002, 26 (1): 71 - 84.
- [39] LOKMAN P M, VERMEULEN G, LAMBERT J D. Gonad histology and plasma steroid profiles in wild New Zealand freshwater eels (*Anguilla dieffenbachii* and *A. australis*) before and at the onset of the natural spawning migration. I. Females [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 1998, 19 (4): 325 - 338.

Impacts of artificial maturation inducing hormone HCG and LHRHa on the physiological fluctuation of female honeycomb grouper, *Epinephelus merra*, during its spawning season and comparison between the two hormones

ZUO Yong-song^{1,2}, MASATO Nakachi², MASARU Nakamura³, KIYOSHI Soyano², CHEN Zai-zhong¹, ZHONG Jun-sheng¹

(1. College of Fishery and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Institute for East China Sea Research, Nagasaki, Japan 851-2213; 3. Tropical Biosphere Research Centre, Okinawa, Japan 903-0213)

Abstract: Female honeycomb grouper, *Epinephelus merra*, was selected as research object in this study. Artificial hormones HCG and LHRHa were used for the description and analysis of gonad developmental changes and sexual steroids fluctuation following hormone injection. Purpose of this study is to establish reliable fundamental information for artificial reproduction of honeycomb grouper, and offer significant reference on manipulation practice. According to the results, both the hormones HCG and LHRHa significantly induced spawning and the releasing of MIS, which determines success of ovulation; Estradiol level of honeycomb grouper decreased significantly after spawning identifying the lunar-related periodicity of the ovary development in honeycomb grouper species; In fishery productive practice, it is very important to confirm the ovary developmental stage before hormone injection in order to enhance success of inducing maturation, especially for LHRHa injection of which the effectiveness of inducing maturation was the best; As for honeycomb grouper with most oocytes that were in early stage of development, effectiveness of HCG was higher than that of LHRHa, but it was still unsatisfying. Considering the best effectiveness for the ovaries which completed vitellogenesis in LHRHa treatment group and its other advantages over HCG, we highly recommend the application of LHRHa in honeycomb grouper reproductive industry.

Key words: honeycomb grouper (*Epinephelus merra*); human chorionic gonadotrophin (HCG); luteinizing hormone-releasing hormone analogue (LHRHa); estradiol (E_2); maturation inducing substance (MIS)