

甲状腺素和生长激素与斜带石斑鱼 早期个体发育的关系*

冉雪琴, 李文笙, 林浩然

(中山大学水生经济动物研究所//广东省水生经济动物良种繁育重点实验室, 广东 广州 510275)

摘 要: 采用放射免疫法测定了斜带石斑鱼卵、胚胎及仔鱼组织的三碘甲腺原氨酸 (T_3) 水平。斜带石斑鱼未受精卵中含有较高的 T_3 水平, 达每克体质量 2.75 ng, 于开口期升至每克体质量 6.28 ng, 之后保持在较低水平。用 T_3 浸泡处理 4~5 周仔鱼, 当 T_3 浓度达到 10^{-8} mol/L 以上时, 外源 T_3 才能引起组织 T_3 水平增加; 10^{-8} mol/L 的作用比 10^{-7} mol/L 的作用弱, 浸泡 24 h 所引起的 T_3 增加幅度明显高于 72 h; 对 4 周仔鱼的影响明显强于 5 周仔鱼。这些结果证实了斜带石斑鱼卵中存在母源 T_3 , 其自身内分泌腺的分化可能始于孵化期或开口期, 处于变态后期的仔鱼已具有一定的调节组织甲状腺素水平的能力。外源 T_3 能影响 4~5 周仔鱼组织 T_3 水平的最低浓度为 10^{-8} mol/L, 浸泡 24 h 对发育早期的仔鱼作用较强。用 RT-PCR 检测了斜带石斑鱼卵、胚胎及仔鱼生长激素 (growth hormone, GH) mRNA 的表达情况, 表明未受精卵中有较高水平的 GH mRNA 表达, 受精卵至囊胚期胚胎的 GH mRNA 表达水平较低, 原肠期以后, 胚胎 GH mRNA 的表达量明显增加, 进一步证明硬骨鱼从受精卵开始就存在 GH mRNA 的表达, 并在自身内分泌腺分化之前参与鱼类早期发育的调节。总之, 斜带石斑鱼的早期发育受甲状腺素和生长激素的共同调节。

关键词: 斜带石斑鱼; 甲状腺素; 生长激素; 早期个体发育

中图分类号: Q451 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2003) 04-0074-05

斜带石斑鱼是东南亚沿海一带重要的海水养殖鱼类, 在早期个体发育中要经过卵黄囊被吸收, 延长的背、腹鳍棘条被吸收, 斜带和色素逐渐形成, 从浮游转变成底栖生活方式等变态发育过程^[1]。石斑鱼在育苗期死亡率很高, 孵出仔鱼的存活率不到 10%, 这严重地影响了斜带石斑鱼种苗的规模化生产^[2]。研究表明, 甲状腺素能促进仔鱼的早期发育, 明显提高仔鱼的存活率。投喂三碘甲腺原氨酸 (Triiodothyronine, T_3), 能明显促进银大麻哈鱼、大鳞大麻哈鱼、大西洋鲑、硬头鲂等幼鱼的生长; 用甲状腺素 (Thyroid hormone, TH) 浸泡能明显提高罗非鱼、鲤鱼、遮目鱼、条纹狼鲈、牙鲆仔鱼的存活率和生长速率^[3]; TH 能促进变态期比目鱼仔鱼消化腺上皮细胞的功能性分化, 促进肠道上皮细胞对蛋白及脂肪颗粒的胞饮作用^[4], 从而促进仔鱼消化系统的发育, 促进食物的消化和吸收。用硫脲处理处于变态中期的比目鱼, TH 水平降低, 变态停滞, 产生大型的浮游仔鱼^[5], 表明甲状腺素对变态的完成是必需的。然而, 对点蓝子鱼雌鱼注射甲状腺素并不能增加孵化率, 对仔鱼的生长亦无明显的

促进作用^[6]; 用高剂量的 T_3 浸泡条纹鲈仔鱼, 使其体内 T_3 水平增加, 但高水平的 T_3 却阻碍仔鱼的生长, 并有致畸作用^[7]。这些结果表明, 甲状腺素能促进仔鱼的个体发育, 但显然存在一个有效范围。

另一个直接影响鱼类早期个体发育的激素是生长激素 (Growth hormone, GH)。研究表明, 甲状腺素对仔鱼的促生长作用至少有一部分是通过对 GH 的影响实现的。 T_3 增加虹鳟 GH mRNA 水平及其 GH 的合成, 就是通过对 GH 基因转录水平的作用实现的^[8]。迄今在罗非鱼胚胎^[9]、虹鳟胚胎^[10]、遮目鱼卵及仔鱼^[11]中检测到 GH mRNA 的表达; 但牙鲆仔鱼的免疫组化研究证实, GH 细胞出现于卵黄吸收完全之时^[4], 因此鱼类卵或胚胎中存在的 GH mRNA 及其表达产物 GH 在内分泌腺出现功能性分化之前调控早期发育过程。总之, GH 和 TH 共同参与仔鱼的早期个体发育。

本文通过研究斜带石斑鱼早期个体发育过程中的 TH 变化, 外源 TH 对仔鱼组织 T_3 水平的影响,

* 收稿日期: 2002—07—15
基金项目: 国家 863 资源与环境技术领域海洋生物技术主题资助项目 (2001AA621010); 国家自然科学基金委农业倾斜专项基金项目 (39970586)
作者简介: 冉雪琴 (1968 年生), 女, 博士, 现在贵州大学工作; 通讯联系人: 林浩然; E-mail: ls32@zsu.edu.cn

分析斜带石斑鱼卵、胚胎及仔鱼中 GH mRNA 的表达情况，探讨 GH、TH 与斜带石斑鱼的早期发育之间的关系。

1 材料与方法

1.1 样品的采集

斜带石斑鱼受精卵采自广东省大亚湾水产养殖中心，按不同发育期采取鱼卵及仔鱼，一部分样品于 Trizol (GiBco BRL) 中匀浆，提取总 RNA，用于 RT-PCR 的测定；另一部分样品直接冻存于 -80°C ，用于甲状腺素的放免测定。

1.2 T_3 浸泡实验

实验在广东省大亚湾水产养殖中心进行。
 T_3 浸泡实验分为对照组和 T_3 (Sigma) 处理组， T_3 处理组设 10^{-10} 、 10^{-9} 、 10^{-8} 和 10^{-7} mol/L 4 个浓度浸泡孵后 4 周、5 周仔鱼，每个处理设 2 个重复。将 100 尾孵后 4 周仔鱼放入一个鱼缸，作为 4 周仔鱼孵育实验的一个处理， T_3 浸泡 24、72 h 后取样，每份样约 30~40 尾仔鱼；将 50 尾孵后 5 周仔鱼置于一个鱼缸中，作为 5 周仔鱼孵育实验的一个处理， T_3 浸泡 24、72 h 取样，每份样约 15~20 尾仔鱼。暗光，海水人工充气条件下，饲喂轮虫及强化颗粒饵料。各样品直接冻存于 -80°C ，待测组织 T_3 含量。

1.3 RIA 测定组织 T_3 水平

采用甲醇/异丙醇抽提法抽提样品中的甲状腺素^[7]，用 T_3 放免测定试剂盒（北京北方生物技术研究所）测定卵及仔鱼组织中的 T_3 水平。数据分析采用 SPSS 统计分析系统进行，采用 Duncon's 新复极差分析。

1.4 RT-PCR 测定 GH mRNA 的表达

卵及仔鱼样品于 Trizol 试剂中匀浆后，参照试剂说明书抽提总 RNA。合成一对特异性引物，正向引物：5'-TCATGGTACCCAGCCAATCACAGACGGCCAG-3'，
反向引物：5'-GACTGAATTCCTACAGGTACAGTTGGCCTC-3'，

加入 1 μg 总 RNA，经 RT-PCR (QIAGEN One-step RT-PCR kit) 扩增 GH DNA 条带。PCR 反应条件：逆转录反应 30 min， 50°C ； 95°C ，15 min； 94°C ，45 s， 65°C ，30 s， 72°C ，90 s，35 个循环，最后 72°C 延伸 10 min；同时用另一对特异性 β -Actin 引物，同样条件扩增 β -Actin DNA 条带。PCR 产物以 1% 琼脂糖凝胶电泳检测，EB 染色后，于 Bio-Rad 凝胶成像系统 (Bio-Rad Gel Doc 2000, USA) 扫描

条带密度，以 β -Actin 条带密度做为内标准。

2 结果

2.1 仔鱼组织 T_3 水平的测定

采用异源 T_3 放射免疫测定法测定了卵、胚胎及仔鱼的组织 T_3 水平，结果见图 1。将仔鱼甲状腺素样品进行二倍稀释，测得的样品稀释曲线与 T_3 标准曲线相平行，表明所用异源 T_3 放射免疫测定试剂盒可以用于斜带石斑鱼仔鱼组织 T_3 水平的测定。

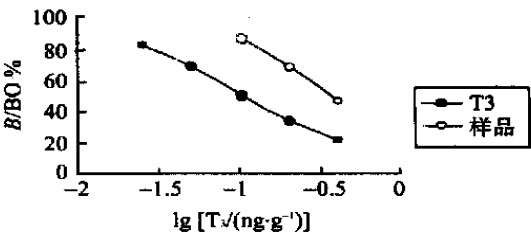


图 1 T_3 放射免疫测定标准曲线与样品竞争性曲线
Fig.1 The standard curve of T_3 RIA and the competitive curve of samples

对斜带石斑鱼卵，不同发育期胚胎及仔鱼组织的基础 T_3 水平进行了测定（图 2）。未受精卵中存在较高水平的 T_3 ，达每克体质量 2.75 ng，受精卵及胚胎 T_3 含量逐渐降低，至初孵仔鱼组织 T_3 含量增至每克体质量 3.05 ng，开口期仔鱼组织 T_3 含量最高，达每克体质量 6.28 ng，之后一直保持在较低水平直至孵后第 55 天。

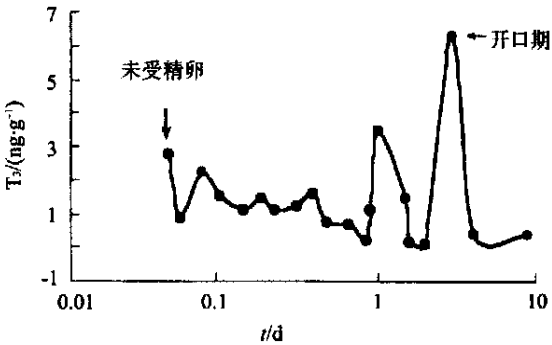


图 2 斜带石斑鱼卵及仔鱼组织基础甲状腺素变化曲线
Fig.2 Changes of T_3 in the eggs and larvae of grouper.

2.2 外源 T_3 对仔鱼组织 T_3 水平的影响

采用 10^{-10} 、 10^{-9} 、 10^{-8} 和 10^{-7} mol/L 4 种 T_3 浓度浸泡处理 4~5 周仔鱼，结果见图 3。 T_3 浸泡 4 周仔鱼组，无论处理 24 h 还是 72 h，仅 10^{-8} 和 10^{-7} mol/L T_3 两个组仔鱼的组织 T_3 水平明显高于对照组 ($P < 0.05$)， 10^{-10} 和 10^{-9} mol/L 对仔鱼 T_3 水平的影响均不显著；作用 24 h 所引起的仔鱼 T_3 水平升高

趋势明显高于作用 72 h (图 3 (a)); 对 5 周仔鱼同样处理, 结果相似 (图 3 (b)). 结果表明, 对于 4、5 周仔鱼, T_3 浸泡浓度为 10^{-8} 、 10^{-7} mol/L 时能明显升高仔鱼组织的 T_3 水平, 并呈剂量依存关系; 作用时间延长所引起的 T_3 升高趋势减缓。

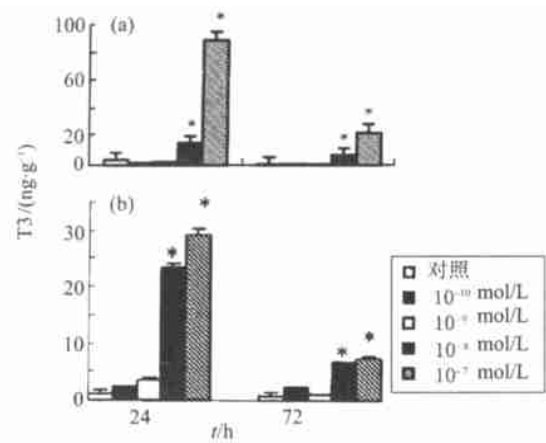


图 3 外源 T_3 作用时间对仔鱼组织 T_3 水平的影响

Fig.3 T_3 content of 4-week and 5-week grouper larvae dealing with T_3 at different time

a: 4 周仔鱼 T_3 含量

b: 5 周仔鱼 T_3 含量

* 表示 T_3 处理 24 h 与处理 72 h 之间的差异显著

外源 T_3 对 4 周仔鱼的作用与对 5 周仔鱼的作用相比 (图 4), 采用 10^{-7} mol/L 的 T_3 处理仔鱼, 无论作用 24 h 还是 72 h, 对 4 周仔鱼的作用均比对 5 周仔鱼的作用强 ($P < 0.05$)。

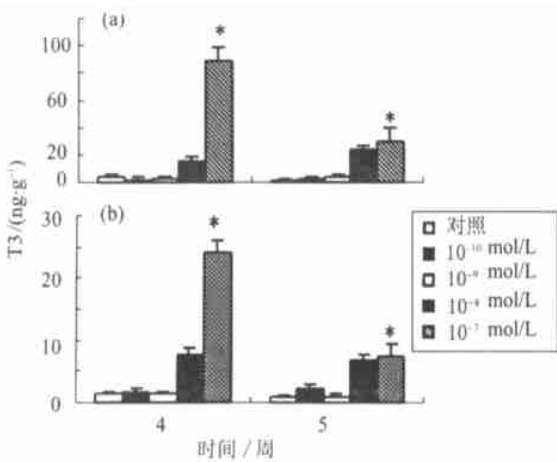


图 4 外源 T_3 对 4 周和 5 周斜带石斑鱼仔鱼组织 T_3 浓度的作用

Fig.4 TH effects to the tissue T_3 concentration of 4-week and 5-week larvae

a: T_3 处理 24 h; b: T_3 处理 72 h

*: 表示 4 周仔鱼与 5 周仔鱼之间的 T_3 含量差异显著

2.3 卵及仔鱼 GH mRNA 的表达

以斜带石斑鱼未受精卵、胚胎及仔鱼的总 RNA 为模板, 用特异性 GH 引物、经 RT-PCR 扩增出 560 bp DNA 条带, 同样条件扩增出 282 bp 的 β -Actin DNA 条带, 亮度基本相同, 表明样品中总 RNA 量基本相同。阴性对照未扩出带 (图 5 (a))。以 β -Actin 条带密度为内标准, 对相应 GH 条带密度进行校正后可见 (图 5 (b)), 未受精卵中有大量的 GH mRNA 表达, 受精卵至囊胚期胚胎 (受精后 5.5 h) 的 GH mRNA 处于低水平表达, 原肠期胚胎 (受精后 10.5 h) 至孵后第 14 天仔鱼 GH mRNA 大量表达。

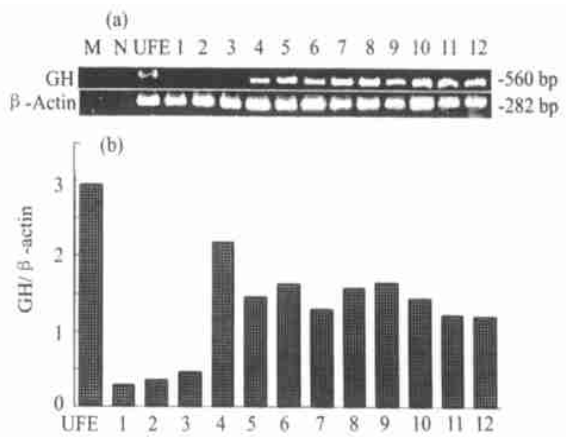


图 5 斜带石斑、斑鱼卵、胚胎及仔鱼 GH mRNA 的表达

Fig.5 GH mRNA ecpresion in unfertilized eggs, embryos and larval stages of grouper determined by semiquantitative RT-PCR

a: GH, β -Actin RT-PCR 产物琼脂糖电泳图

b: GH mRNA 含量表示为 GH 密度与 β -Actin 密度的比率

M: 相对分子质量; N: 阴性对照; UFE: 客观存在精卵;

1: 受精卵(0.5 h); 2: 受精卵(2.5 h); 受精卵(5.5 h);

4: 受精卵(10.5 h); 5: 受精卵(15.5 h); 4: 新孵仔鱼;

7: 孵后 1 d 仔鱼; 8: 孵后 2 d 仔鱼; 9: 孵后 3 d 仔鱼;

10: 孵后 4 d 仔鱼; 11: 孵后 10 d 仔鱼; 12: 孵后 14 d 仔鱼

3 讨论

对斜带石斑鱼未受精卵、受精卵、胚胎及仔鱼组织 T_3 水平的测定结果表明, 在未受精卵中含有较高水平的 T_3 。Kobuke 等^[12]的实验证实大麻哈鱼初孵仔鱼中, 仅 4% 的甲状腺素分布于仔鱼组织中, 96% 的甲状腺素分布于卵黄中; 给雌性点蓝子鱼亲鱼注射 TH 能直接引起卵中 TH 水平的增加^[6], 证明甲状腺素能通过卵巢进入卵、仔鱼, 储存于卵黄囊中, 并从卵黄进入组织, 以供早期发育所需。本文研究结果也证实了斜带石斑鱼卵、胚胎和仔鱼

中存在母源 T_3 。

斜带石斑鱼开口期仔鱼组织 T_3 水平达每克体质量 6.28 ng，比未受精卵高出 2 倍多。Tanaka 等^[4] 用免疫组化方法分析了 28 种海水鱼甲状腺滤泡的发育情况，并将海水鱼甲状腺滤泡的发育分为两种类型：一类甲状腺滤泡于孵化时分化，另一类甲状腺滤泡于卵黄吸收将尽时分化。斜带石斑鱼组织 T_3 含量于开口期出现明显的高峰，此时卵黄中的母源甲状腺素已消耗将尽，大量 T_3 的出现只能来自内源性甲状腺素的产生；用免疫组化检测到鲈形目西班牙鲈鱼^[4] 的甲状腺滤泡出现于孵化后 3 d。本文结果提示，斜带石斑鱼的甲状腺滤泡很有可能在开口期分化。

自开口期之后组织 T_3 降至低水平，并一直保持到孵后 55 d，很可能与 T_3 的消耗有关。de Jesus 等^[1] 对斜带石斑鱼甲状腺素水平的测定结果表明，自孵出 15 d 起，仔鱼组织 T_3 水平保持在相对平稳的低水平，与本文结果相似，但四碘甲腺原氨酸 (T_4) 水平于孵后 30 d 起明显增加，至变态期结束进入稚鱼期才下降，说明组织产生的 T_4 于变态后期明显增加，但 T_3 却一直保持在低水平，体现了此时的仔鱼已具有调控组织 T_3 水平的能力，使组织 T_3 水平保持在稳定的范围内。真骨鱼类甲状腺滤泡只能合成 T_4 ， T_3 主要由肝脏等组织中的 5'-单脱碘酶将 T_4 转变成 T_3 ^[13]，仔鱼很可能是通过对 5'-单脱碘酶活力的控制，调节组织 T_3 水平稳定于基础水平。

T_3 浸泡实验表明，对于 4、5 周仔鱼，低浓度的 T_3 并不能引起仔鱼组织 T_3 水平的明显改变，只有当 T_3 处理浓度升高到 10^{-8} 、 10^{-7} mol/L 时，才能引起组织 T_3 水平的增加，并呈现出一定的剂量关系，然而这种剂量关系随时间的延长而减弱；外源 T_3 对 4 周仔鱼的作用明显强于对 5 周仔鱼的作用。这些结果表明，采用 T_3 浸泡法能提高仔鱼组织的 T_3 水平，发育期越早的仔鱼，其 T_3 的提高作用越明显。 T_3 含量的增加可通过 T_3 受体的作用促进仔鱼的变态发育；此外 T_3 可能通过促进 GH mRNA 的转录提高仔鱼的 GH 水平，从而促进仔鱼的生长。来自大鼠垂体瘤细胞的研究结果表明，核内的 T_3 受体对 GH 基因的转录有直接的正调控作用，GH mRNA 的合成、基因转录速率与 T_3 核受体占有率有很好的平行关系，并且不会因反应初始 T_3 与受体的结合而滞后。研究发现大鼠 GH 基因启动子区域存在甲状腺素核内受体的结合位点，甲状腺素通

过其受体，与邻近的 Pit-1 应答元件相互作用，从而激活 GH 基因的特异性表达^[14]。在鱼类中，于 GH 基因的启动子区域也发现了甲状腺素应答元件样序列^[15]，并且可能通过相似的方式激活 GH 基因的表达。 T_3 增加虹鳟 GH mRNA 水平及其 GH 的合成，就是通过对 GH 基因转录水平的作用实现的^[8]。

对斜带石斑鱼卵、胚胎、及仔鱼 GH mRNA 表达水平的检测结果表明，斜带石斑鱼未受精卵中有相当量的 GH mRNA 表达，受精卵至囊胚期胚胎的 GH mRNA 处于较低的表达水平，原肠期胚胎至孵后第 14 天仔鱼 GH mRNA 的表达均处于较高水平。本文结果与遮目鱼^[11] 的测定结果有所不同，遮目鱼胚胎期至初孵仔鱼期间 GH mRNA 均处于较低水平，孵后第 2 天起，其表达水平才开始增加。近年来，陆续在脊椎动物中发现卵及胚胎中存在许多母源的激素和生长因子，在自身内分泌腺分化前调节胚胎的发育。迄今在罗非鱼胚胎中发现存在 GH mRNA 和 PRL mRNA^[9]，虹鳟胚胎中存在 GH、PRL、SL mRNA 表达^[10]，遮目鱼卵、胚胎及仔鱼中存在 GH mRNA^[11]。Ayson 等^[9] 的研究发现，当把罗非鱼胚胎从海水移到淡水时，胚胎中的 GH mRNA 水平不变，PRL mRNA 水平明显增加。综合本文结果及其他学者的研究结果，说明鱼类生长激素早在未受精卵中就有一定量的表达，在腺垂体出现功能性分化之前对鱼类的早期发育起调节作用。

总之，在斜带石斑鱼的早期发育中，甲状腺素和生长激素都起着不可忽视的调节作用。

参考文献：

[1] DE JESUS E G T, TOLEDO J D, SIMPAS M S. Thyroid hormones promote early metamorphosis in grouper (*Epinephelus coioides*) larvae [J]. Gen Comp Endocrinol, 1998, 112, 10-16.

[2] IKUMURA S. Seed production of groupers in Japan [J]. Pro Second Int Seminar on Fisheries Sci, 1997, 97-102.

[3] 陈松林. 鱼类生长内分泌学和鱼类养殖 [J]. 水产学报, 1992, 16(1): 91-100.

[4] TANAKA M, TANANGONAN J B, TAGAWA M, et al. Development of the pituitary, thyroid and interrenal glands and applications of endocrinology to the improved rearing of marine fish larvae [J]. Aquaculture, 1995, 135, 111-126.

[5] SCHREIBER A M, SPECKER J L. Metamorphosis in the summer flounder (*Paralichthys dentatus*): stage-specific developmental response to altered thyroid status [J]. Gen Comp Endocrinol, 1998, 111, 156-166.

[6] AYSON F G, LAM T J. Thyroxine injection of female

- rabbitfish (*Siganus guttatus*) broodstock: changes in thyroid hormone levels in plasma, eggs, and yolk-sac larvae, and its effect on larval growth and survival[J]. *Aquaculture*, 1993, 109, 83—93.
- [7] HUANG L Y, SPECKER J L, BENGTSON D A. Effect of triiodothyronine on the growth and survival of larval striped bass (*Morone saxatilis*) [J]. *Fish Physiol Biochem*, 1996, 15(1), 57—64.
- [8] LUO D, MCKBOWN B A. The effect of thyroid hormone and glucocorticoids on carp growth hormone-releasing factor (GRF)-induced growth hormone (GH) release in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1991, 99A(4), 621—626.
- [9] AYSON F G, KANEKO T, HASEGAWA S, et al. Differential expression of two prolactin and growth hormone genes during early development of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) in fresh water and seawater: implications for possible involvement in osmoregulation during early life stages [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1994, 95(1), 143—152.
- [10] YANG B Y, GREENE M, CHEN T T. Early embryonic expression of the growth hormone family protein genes in the developing rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Mo Reprod Dev*, 1999, 53, 127—134.
- [11] DE JESUS E G T, AYSON F G, AMEMIYA Y, et al. Milkfish (*Chanos chanos*) growth hormone cDNA cloning and mRNA expression in embryos and early larval stages [J]. *Aquaculture*, 2002, 208, 177—188.
- [12] KOBUE L, SPECKER J L, BERN H A. Thyroxine content of eggs and larvae of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* [J]. *J Exp Zool*, 1987, 242, 89—94.
- [13] DISTEFANO III J, RON B, NGUYEN T T, et al. 3,5,3'-triiodothyronine (T_3) clearance and T_3 -glucuronide (T_3G) appearance kinetics in plasma of freshwater-reared male tilapia, *Oreochromis mossambicus* [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1998, 111, 123—140.
- [14] YAFFE B M. Molecular mechanisms of regulation of growth hormone gene expression in cultured rat pituitary cells by thyroid and glucocorticoid hormones[D]. 1989.
- [15] MELAMED P, ROSENFELD H, ELIZUR A, et al. Endocrine regulation of gonadotropin and growth hormone gene transcription in fish [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1998, 119, 325—338.

Research of Thyroid Hormone and Growth Hormone in the Early Development of Grouper (*Epinephelus coioides*)

RAN Xue-qin, LI Wen-sheng, LIN Hao-ran

(Institute of Aquatic Economic Animals and Guangdong Provincial //

Key Laboratory for Aquatic Economic Animals, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The tissue triiodothyronine (T_3) content and the expression of growth hormone gene during early development of grouper (*Epinephelus coioides*) were determined by radioimmunoassay (RIA) and reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) respectively. T_3 content in unfertilized eggs was 2.75 ng/g BW (body weight). At the first feeding stage, the content of T_3 reached to 6.28 ng/g BW and then dropped to a low level until 55-days after hatched. The tissue T_3 level of 4- and 5-week-old larvae could be obviously elevated when they were immersed in 0.01×10^{-6} or 0.1×10^{-6} T_3 in a dose-dependent manner. The treatment in 24 h was more effective than 72 h. These results showed that maternal T_3 supplement existed in grouper eggs and new-hatched larvae. The thyroid follicles of larvae might secrete thyroxine at the first feeding stage. The external T_3 could enhance larvae tissue T_3 content by immersing larvae in 0.01×10^{-6} or 0.1×10^{-6} T_3 . The 24 hrs treatment was more effective. Total RNA was extracted from pooled eggs or larvae at different development stages. Using a pair of special primers, the 560 bp DNA bands of growth hormone were amplified from the total RNA of eggs, embryos and larvae samples by RT-PCR. The growth hormone gene expression was high in unfertilized eggs, but decreased from fertilized eggs to blastula (fertilized 5.5 h), and increased from gastrula (fertilized 10.5 h) to day 14 after hatched. The results indicated that growth hormone mRNA expressed in grouper eggs, embryos and larvae. Growth hormone might be an important role in the development of grouper embryo and larvae. In conclusion, both of thyroid hormone and growth hormone contributed to the early development of grouper.

Key words: thyroid hormone; growth hormone; early development; *Epinephelus coioides*