

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.16205

盐度对杂交石斑鱼受精卵孵化和卵黄囊仔鱼形态及活力的影响

黄建盛¹, 陈刚^{1,2,3}, 张健东¹, 王忠良^{1,2,3}, 汤保贵^{1,2,3}, 周晖¹

1. 广东海洋大学 水产学院, 广东 湛江 524025;

2. 广东省南海水产经济动物增殖重点实验室, 广东 湛江 524025;

3. 广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室, 广东 湛江 524025

摘要: 为了研究盐度对褐点石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus*)♀×清水石斑鱼(*Epinephelus polyphekadion*)♂杂交后代(简称杂交石斑鱼)受精卵孵化、卵黄囊仔鱼形态及活力的影响, 将杂交石斑鱼受精卵置于不同盐度水体中, 观察盐度胁迫下卵径、油球径、孵化率及畸形率, 以及孵化后卵黄囊仔鱼形态变化和活力状况。结果表明, 在本研究条件下, 受精卵卵径随盐度降低而增大, 油球径不随盐度变化而变化。在盐度 18~36 范围内均能孵化仔鱼, 但因盐度不同孵化率和初孵仔鱼畸形率有显著差异($P<0.05$); 随盐度升高, 孵化率呈先升后降的变化, 初孵仔鱼畸形率则相反。盐度 24~36 组孵化后 3 d 仔鱼卵黄囊几乎完全消耗, 组间无显著差异($P>0.05$)。在盐度 24~36 范围内, 随着盐度的增加, 仔鱼的不投饵存活系数(SAI 值)呈先升后降的变化曲线; 盐度 30~33 范围内, 初孵仔鱼 SAI 值大于 5; 5 日龄仔鱼全部死亡, 半数死亡时间出现在孵化后 3.5 d。综合分析表明, 该杂交石斑鱼受精卵孵化及仔鱼培育的适宜盐度范围为 24~36, 最适盐度范围为 30~33。

关键词: 褐点石斑鱼; 清水石斑鱼; 杂交后代; 孵化率; 卵黄囊仔鱼; 盐度

中图分类号: S965

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2017)03-0507-09

采用不同类型的亲本进行杂交, 可以使杂交后代增加变异性和异质性, 综合双亲的优良性状, 使后代获得较大的遗传改良, 出现可利用的杂种优势, 从而在杂交后代中出现更具有积极效益的新品种。在鱼类品种改良和生长中发挥作用, 是鱼类育种的有效途径之一。石斑鱼作为重要的海水养殖经济鱼类, 因其味道鲜美、营养丰富, 在中国沿海地区广泛养殖, 然而, 石斑鱼产业可持续发展受到种质资源退化和鱼苗大规模生产的制约, 为了解决这些问题, 杂交技术被引入石斑鱼人工繁育^[1]。目前, 国内学者相继进行了斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)♀×赤点石斑鱼(*E. akaara*)♂^[2]、斜带石斑鱼♀×鞍带石斑鱼(*E. lanceolatus*)♂^[3]、褐点石斑鱼(*E. fuscoguttatus*)♀(俗称老虎斑)×鞍带石斑鱼♂^[4]、云纹石斑鱼(*E. moara*)♀×七

带石斑鱼(*E. septemfasciatus*)♂^[5]、云纹石斑鱼♀×赤点石斑鱼(*E. akaara*)♂^[6]、云纹石斑鱼♀×鞍带石斑鱼♂^[7]等组合的杂交育种研究, 并利用转录组分析揭示石斑鱼杂交优势的分子机制^[1]。本研究团队近期开展了褐点石斑鱼♀×清水石斑鱼(*E. polyphekadion*)♂(俗称杉斑)杂交育种研究, 并成功培育出杂交石斑鱼子一代。国外学者曾报道该杂交石斑鱼生长速度比亲本快, 具有生长杂交优势^[8], 而国内尚未见相关研究报道。

在水产养殖生产实践中, 盐度是促进海水鱼胚胎发育及仔鱼生长发育有效调控的手段之一。海水鱼类在早期发育阶段往往对盐度胁迫非常敏感, 若胁迫超过自身调节能力则会导致死亡^[9]。已有研究证实, 石斑鱼种类胚胎及仔鱼对盐度适应范围因种而异。如点带石斑鱼(*E. malabaricus*)最

收稿日期: 2016-07-11; 修订日期: 2016-09-20.

基金项目: 广东省科技厅项目(2016B020201009).

作者简介: 黄建盛(1981-)男, 博士, 讲师, 主要研究方向为水产经济动物养殖生理生态学. E-mail: huangjs@gdou.edu.cn

通信作者: 陈刚, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为水产经济动物养殖生理生态学. E-mail: cheng@gdou.edu.cn

适孵化盐度为 30.5~32.5^[10]; 斜带石斑鱼最适盐度为 20~30^[11]; 赤点石斑鱼胚胎发育的最适盐度为 27~35^[12]。目前, 杂交石斑鱼(褐点石斑鱼♀×清水石斑鱼♂)早期发育阶段对盐度的适应性国内外尚未有相关报道。本研究探讨不同盐度下该种杂交石斑鱼受精卵孵化、卵黄囊仔鱼形态及活力的变化情况, 为其开展人工育苗提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 受精卵的来源

本研究于 2016 年 5 月在广东海洋大学鱼类增殖养殖实验室进行。褐点石斑鱼雌性亲鱼(5 龄)、清水石斑鱼雄性亲鱼(7 龄)由海南省俊泓实业有限公司养殖场提供。在养殖场通过激素诱导褐点石斑鱼亲鱼排卵, 通过人工授精技术获得杂交石斑鱼的受精卵。受精卵在盐度 31 的自然海水孵化桶逐渐降温至 22℃, 然后用 150 目筛绢网捞取上浮卵打包。采用双层尼龙袋充纯氧方式, 在密封泡沫箱低温运输约 8 h 至实验室, 运输密度为 10 g/L。运至实验室后, 先平衡孵化水体与尼龙袋内的水体温度, 然后将受精卵放置于孵化水槽(70 cm×50 cm×60 cm)微充气进行孵化。受精卵抵达实验室后, 显微镜下观察其发育至原肠中期, 并于此发育时期开始实验。

1.2 实验方法

1.2.1 盐度胁迫下孵化率与畸形率 设盐度分别为 18、21、24、27、30、33、36, 以过滤后湛江沿海自然海水(盐度 31)为对照组。高盐度海水组用过滤后自然海水与海水晶配制, 曝气 3 d 而成, 低盐度组用过滤后自然海水与蒸馏水配制而成。在 1000 mL 烧杯中, 分别装入 700 mL 实验设置的不同盐度孵化水体, 每个烧杯放 200~250 个受精卵, 每个盐度梯度设 3 个重复, 孵化密度约为 0.3 个/mL, 微充气孵化, 使得受精卵轻度翻滚。为避免孵化温度波动太大, 实验在恒温水槽中进行。孵化期间水质指标: 水温(27.5±0.5)℃, 溶解氧 5.8 mg/L, pH 8.0, 总碱度 156 mg/L, 自然光照, 光照强度控制在 600~800 lx, 氨氮和亚硝酸盐浓度未测出。连续观察各盐度组孵化情况, 记录仔鱼出膜时间, 并于出膜时间后 6 h 用海水配制的

3%甲醛溶液固定所有的初孵仔鱼和未孵出的受精卵^[10], 统计孵化率。以初孵仔鱼脊椎弯曲、油球异位或异数为畸形仔鱼的判断标准^[10]。孵化率、畸形率按以下公式进行计算: 孵化率(%)=初孵仔鱼总数/受精卵总数×100%; 畸形率(%)=畸形仔鱼数/全部初孵仔鱼总数×100%。

1.2.2 卵黄囊仔鱼卵黄囊及油球容积的变化 与 1.2.1 同步进行。在 1000 mL 烧杯中, 有效水体 700 mL, 每个烧杯放 200~250 个受精卵, 每个盐度梯度设 3 个重复。受精卵放入实验设置的盐度水体后 2 h, 每个烧杯取 10 个卵用目测微尺在显微镜下测量卵径和油球径。剩余受精卵继续孵化至仔鱼出膜, 并记录出膜时间, 每隔 12 h 用胶头滴管吸取每烧杯仔鱼 10 尾, 在显微镜下测量卵黄囊长径、短径及油球直径。卵黄囊容积计算公式: $V=1/6\pi l h^2-1/6\pi d^3$; 油球容积计算公式: $V=1/6\pi d^3$ (l 为卵黄囊长径, h 为卵黄囊短径, d 为油球直径)。

1.2.3 不投饵存活系数的测定 待孵化水槽的仔鱼孵出后, 仔细用勺子挑选肉眼观察健康的仔鱼 100 尾, 放入已准备好的不同盐度水体的 1000 mL 烧杯中, 有效水体 700 mL, 每个盐度梯度设 3 个重复, 置于恒温水槽中静水不投饵培育, 实验期间水质指标同 1.2.1。每天计算死亡的仔鱼数, 直至仔鱼全部死亡, 然后比较其 SAI 值。

$$SAI = \sum_{i=1}^k (N - h_i) \times i / N$$

式中, N 为实验起始时的仔鱼数; K 为仔鱼全部死亡所需的天数; h_i 为第 i 天仔鱼的累计死亡数。

1.3 数据处理

数据结果以平均值±标准差($\bar{x} \pm SD$)表示。采用 SPSS11.0 软件对不同盐度下的实验数据进行单因素方差分析和 Duncan 多重比较, $P < 0.05$ 时表示差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 盐度对杂交石斑鱼受精卵卵径和油球径的影响

杂交石斑鱼受精卵在不同盐度下 2 h 后, 测量卵径和油球径的结果见表 1。由表 1 可知, 盐度 27 及高于此盐度的各组与对照组之间卵径无显著

表 1 不同盐度下 2 h 后杂交石斑鱼受精卵卵径及油球径的变化

Tab. 1 The characteristics of fertilized egg of hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀×*E. polyphkadion* ♂) under different salinity for 2 h
n=3; $\bar{x} \pm SD$

盐度 salinity	卵径/mm egg diameter	油球径/mm oil globule diameter	油球容积/mm ³ oil globule volume
18	0.8987±0.0034 ^c	0.1975±0.0022 ^a	0.0040±0.001 ^a
21	0.8983±0.0038 ^c	0.1977±0.0018 ^a	0.0040±0.001 ^a
24	0.8846±0.0018 ^b	0.1979±0.0012 ^a	0.0041±0.001 ^a
27	0.8803±0.0007 ^a	0.1980±0.0007 ^a	0.0041±0.001 ^a
30	0.8802±0.0007 ^a	0.1979±0.0012 ^a	0.0041±0.001 ^a
33	0.8801±0.0007 ^a	0.1973±0.0007 ^a	0.0040±0.001 ^a
36	0.8800±0.0007 ^a	0.1973±0.0007 ^a	0.0040±0.001 ^a
31(对照组 control)	0.8801±0.0006 ^a	0.1974±0.0008 ^a	0.0040±0.001 ^a

注: 同一列数据上标不同字母表示盐度组间的差异显著($P<0.05$).
Note: Values within the same column with different letters are significantly different ($P<0.05$).

差异($P>0.05$), 而盐度低于 27 的各组和对照组之间卵径有显著差异($P<0.05$)。受精卵的油球径及油球容积各组与对照组之间均无显著差异($P>0.05$)。
2.2 盐度对杂交石斑鱼受精卵孵化率及初孵仔鱼畸形率的影响

在本研究条件下, 杂交石斑鱼受精卵在盐度 18~36 均能孵出仔鱼(图 1)。由图 1 可知, 随盐度的上升, 孵化率呈先升高后下降的变化, 而初孵仔鱼畸形率则相反(图 2)。单因素方差分析表明, 盐度对受精卵孵化率及初孵仔鱼畸形率均有显著影响($P<0.05$), 盐度 30 组、盐度 33 组与对照组无显著差异($P>0.05$), 而其他盐度组与对照组之间均有显著差异($P<0.05$)。盐度与孵化率及畸形率的关系可用一元二次方程进行描述(图 1、图 2)。

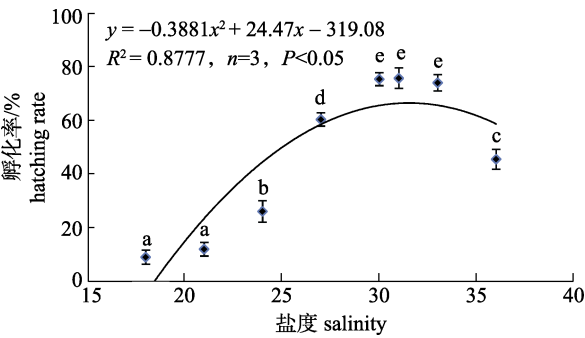


图 1 不同盐度条件下杂交石斑鱼受精卵孵化率的变化
不同字母表示盐度组间的差异显著($P<0.05$).
Fig. 1 The hatching rate of hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀×*E. polyphkadion* ♂) fertilized eggs under different salinity
Values with different letters are significantly different ($P<0.05$).

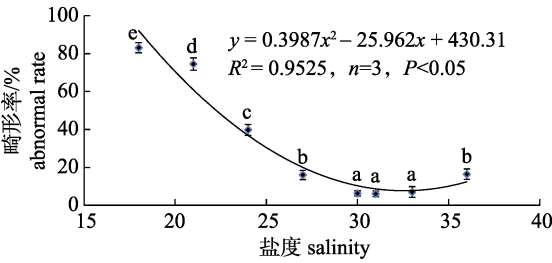


图 2 不同盐度条件下杂交石斑鱼初孵仔鱼畸形率的变化
不同字母表示盐度组间的差异显著($P<0.05$).
Fig. 2 Abnormal rate of the newly hatched larvae of hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀×*E. polyphkadion* ♂) under different salinity
Values with different letters are significantly different ($P<0.05$).

2.3 盐度对杂交石斑鱼仔鱼营养物质消耗及全长的影响

不同盐度下杂交石斑鱼卵黄囊仔鱼期卵黄囊容积及油球径的变化分别见表 2 和表 3。由表 2 可知, 初孵仔鱼阶段盐度 18~24 组的卵黄囊容积显著大于对照组及其他盐度组初孵仔鱼的卵黄囊容积($P<0.05$); 在 1 d 和 2 d 仔鱼阶段, 盐度 36 组的卵黄囊容积则显著小于其他盐度组($P<0.05$), 盐度 24 组则显著大于其他盐度组($P<0.05$), 盐度 27~33 组则与对照组无显著差异($P>0.05$); 在 3 d 仔鱼阶段, 盐度 24~36 组有仔鱼存活, 卵黄囊容积组间无显著差异($P>0.05$), 几乎完全消耗。盐度对杂交石斑鱼仔鱼油球径大小随发育时间延长而减小(表 3), 在盐度组间无显著差异($P>0.05$)。

不同盐度下杂交石斑鱼仔鱼全长测定结果见表 4。由表 4 可知, 在初孵仔鱼阶段, 盐度 27 组

表 2 不同盐度下杂交石斑鱼仔鱼卵黄囊容积的变化

Tab. 2 Volume of yolk sac of larvae of hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀×*E. polyphkadion* ♂) under different salinity
n=3; $\bar{x} \pm SD$; mm³

盐度 salinity	初孵仔鱼 newly hatched larvae	1 d 仔鱼 1 d larvae	2 d 仔鱼 2d larvae	3 d 仔鱼 3 d larvae
18	0.1115±0.0014 ^c	—	—	—
21	0.1115±0.0009 ^c	—	—	—
24	0.1103±0.0015 ^c	0.0405±0.0015 ^d	0.0099±0.0003 ^c	0.0001±0.0000 ^a
27	0.1036±0.0040 ^b	0.0352±0.0007 ^c	0.0069±0.0001 ^a	0.0001±0.0000 ^a
30	0.1036±0.0041 ^b	0.0269±0.0024 ^b	0.0076±0.0002 ^b	0.0001±0.0000 ^a
33	0.1037±0.0037 ^b	0.0231±0.0005 ^b	0.0076±0.0002 ^b	0.0001±0.0000 ^a
36	0.0942±0.0059 ^a	0.0184±0.0003 ^a	0.0067±0.0005 ^a	0.0001±0.0000 ^a
31(对照组 control)	0.1028±0.0039 ^b	0.0273±0.0024 ^b	0.0076±0.0002 ^b	0.0001±0.0000 ^a

注：同一列数据上标不同字母表示盐度组间的差异显著(P<0.05).
Note: Values within the same column with different letters are significantly different (P<0.05).

表 3 不同盐度下杂交石斑鱼仔鱼油球直径的变化

Tab. 3 Oil globule diameter of larvae of hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀×*E. polyphkadion* ♂) under different salinity
n=3; $\bar{x} \pm SD$; mm

盐度 salinity	初孵仔鱼 newly hatched larvae	1 d 仔鱼 1 d larvae	2 d 仔鱼 2 d larvae	3 d 仔鱼 3 d larvae	4 d 仔鱼 4 d larvae
18	0.1632±0.0108	—	—	—	—
21	0.1621±0.0078	—	—	—	—
24	0.1611±0.0012	0.1334±0.0022	0.0895±0.0022	0.0608±0.0020	—
27	0.1612±0.0007	0.1334±0.0022	0.0895±0.0022	0.0606±0.0013	—
30	0.1623±0.0070	0.1336±0.0016	0.0900±0.0025	0.0615±0.0010	0.0410±0.0007
33	0.1593±0.0032	0.1343±0.0018	0.0890±0.0024	0.0610±0.0012	0.0409±0.0006
36	0.1605±0.0006	0.1338±0.0020	0.0892±0.0022	0.0603±0.0012	—
31(对照组 control)	0.1569±0.0044	0.1339±0.0017	0.0895±0.0022	0.0608±0.0020	0.0408±0.0006

注：同一列数据上标不同字母表示盐度组间的差异显著(P<0.05).
Note: Values within the same column with different letters are significantly different (P<0.05).

表 4 不同盐度下杂交石斑鱼仔鱼全长的变化

Tab. 4 Total length of larvae of hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀×*E. polyphkadion* ♂) under different salinity
n=3; $\bar{x} \pm SD$; mm

盐度 salinity	初孵仔鱼 newly hatched larvae	1 d 仔鱼 1 d larvae	2 d 仔鱼 2 d larvae	3 d 仔鱼 3 d larvae	4 d 仔鱼 4 d larvae
18	1.4978±0.0382 ^a	—	—	—	—
21	1.5048±0.0328 ^a	—	—	—	—
24	1.5833±0.0396 ^b	1.8544±0.0144 ^a	2.3491±0.0373 ^a	2.3984±0.0806 ^a	—
27	1.6033±0.0235 ^c	2.2985±0.0164 ^b	2.5778±0.0278 ^b	2.5865±0.1134 ^b	—
30	1.6299±0.0244 ^c	2.5861±0.0267 ^c	2.5766±0.0240 ^b	2.5579±0.1046 ^b	2.614±0.0082 ^a
33	1.5842±0.0495 ^b	2.5686±0.0288 ^c	2.5417±0.0487 ^b	2.5815±0.0263 ^b	2.6136±0.0074 ^a
36	1.5695±0.0336 ^b	2.1396±0.0264 ^{ab}	2.5818±0.0255 ^b	2.5739±0.0242 ^b	—
31(对照组 control)	1.6131±0.0150 ^c	2.5910±0.0225 ^c	2.5491±0.0373 ^b	2.5984±0.0806 ^b	2.6159±0.0071 ^a

注：同一列数据上标不同字母表示盐度组间的差异显著(P<0.05).
Note: Values within the same column with different letters are significantly different (P<0.05).

和盐度 30 组仔鱼全长与对照组之间无显著差异(P>0.05), 其他盐度组仔鱼全长则显著小于对照组(P<0.05)。在孵化后 1 d 仔鱼阶段, 盐度 30 组
和盐度 33 组仔鱼全长与对照组之间无显著差异(P> 0.05)。在 2 d 和 3 d 仔鱼阶段, 盐度 24 组仔
鱼全长显著小于其他盐度组(P<0.05), 盐度 27~36

组仔鱼全长与对照组无显著差异($P>0.05$)。在 4 d 仔鱼阶段, 盐度 30 组与 33 组仔鱼全长与对照组无显著差异($P>0.05$)。

2.4 盐度对杂交石斑鱼仔鱼活力的影响

在不同盐度下测定的杂交石斑鱼仔鱼的不投饵存活系数见表 5。由表 5 可知, 盐度 21 是仔鱼的生存极限值, 在 24 h 的存活率为 0。盐度 27~33 组 24 h 仔鱼存活率均高于 90%, 与对照组之间无显著差异($P>0.05$); 盐度 27~33 组 48 h 仔鱼存活率均高于 75%, 与对照组之间无显著差异($P>$

0.05); 各盐度组 72 h 仔鱼存活率均显著小于对照组($P<0.05$)。随着仔鱼不投饵时间的延长, 各盐度组初孵仔鱼在 120 h 之内全部死亡, 在盐度 24~36 范围内, 随着盐度的增加, 仔鱼的 SAI 值呈先升后降的变化趋势。单因素方差分析表明, 盐度对杂交石斑鱼仔鱼的 SAI 值有显著差异($P<0.05$), 盐度 30 组、盐度 33 组与对照组 SAI 值均大于 5, 组间无显著差异($P>0.05$), 且半数死亡时间出现在第 3.5 天, 其他盐度组半数死亡时间则小于 3 天(图 3)。

表 5 不同盐度下杂交石斑鱼仔鱼存活率
Tab. 5 The survival rate of larvae of hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀×*E. polyphekadion* ♂) under different salinity
 $n=3$; $\bar{x} \pm SD$

盐度 salinity	时间/h time					不投饵存活系数 the survival activity index
	24	48	72	96	120	
18	0.00±0.00 ^a	—	—	—	—	0.00±0.00 ^a
21	0.00±0.00 ^a	—	—	—	—	0.00±0.00 ^a
24	87.67±2.52 ^c	57.33±2.31 ^a	12.33±2.09 ^a	0.00±0.00 ^a	—	2.39±0.11 ^b
27	93.33±1.53 ^d	78.00±2.00 ^b	35.33±4.16 ^c	0.00±0.00 ^a	—	3.55±0.11 ^c
30	94.67±1.53 ^d	75.67±3.51 ^b	59.00±1.73 ^d	32.33±3.06 ^b	0.00±0.00	5.52±0.06 ^d
33	93.33±2.08 ^d	77.33±2.08 ^b	60.33±1.54 ^d	30.33±2.52 ^b	0.00±0.00	5.50±0.10 ^d
36	79.00±4.00 ^b	57.67±2.54 ^a	19.67±3.52 ^b	0.00±0.00 ^a	—	2.53±0.07 ^b
31(对照组 control)	92.33±1.15 ^d	76.33±3.21 ^b	66.33±2.51 ^c	28.00±2.00 ^b	0.00±0.00	5.56±0.04 ^d

注: 同一列数据上标不同字母表示盐度组间的差异显著($P<0.05$).
Note: Values within the same column with different letters are significantly different ($P<0.05$).

初孵仔鱼的 SAI 值(x)与受精卵孵化率(y)相关性见图 4。由图 4 可知, 两者间存在显著的线性相关关系($y=11.715x+10.349$, $df=22$, $F=396.79$, $P=0.000$, $R^2=0.9475$)。

3 讨论

3.1 盐度对受精卵发育及其孵化的影响

水体盐度主要影响鱼类受精卵内渗透压的稳定性^[13], 从而直接影响海水鱼胚胎发育。受精卵渗透压平衡通过原生质层调节, 但该层只具有单向调节能力, 即只具有防止受精卵失水的能力^[9]。本研究中, 受精卵卵径在低盐度情况下要显著大于对照组($P<0.05$), 而高盐度组与对照组之间差异不显著($P>0.05$), 这与条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*)^[14]、点带石斑鱼^[10]结果相类似。

海水鱼受精卵的孵化率及初孵仔鱼畸形率直接反映孵化效果好坏, 是常常被用来确定适宜盐

度的指标之一^[15]。在褐牙鲈(*Paralichthys olivaceus*) ♀×犬齿牙鲈(*P. dentatus*)♂杂交子代^[16]、军曹鱼(*Rachycentron canadus*)^[17]、卵形鲳鲅(*Trachinotus ovatus*)^[18]、点带石斑鱼^[10]等海水鱼类胚胎中发现, 在其适宜盐度范围进行孵化, 由于受精卵原生质层的渗透调节保持卵内环境相对稳定, 从而有较好的孵化效果。若孵化盐度超过适宜范围, 会造成原生质层渗透压平衡能力失调, 胚胎细胞发育不能正常进行, 导致胚胎滞育或仔鱼畸形^[19-20]。在半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)^[21]、黑棘鲷(*Acanthopagrus butcheri*)^[22]、条石鲷^[14]、七带石斑鱼^[23]中, 胚胎高盐或低盐水体下均发现此现象。在本研究中, 综合考虑孵化率和畸形率, 图 1 和图 2 的回归曲线相交点的盐度为 23.5, 认为是杂交石斑鱼受精卵孵化适宜盐度范围的下限。结合表 2~5 的实验结果, 推测受精卵孵化适宜盐度范围为 24~36。

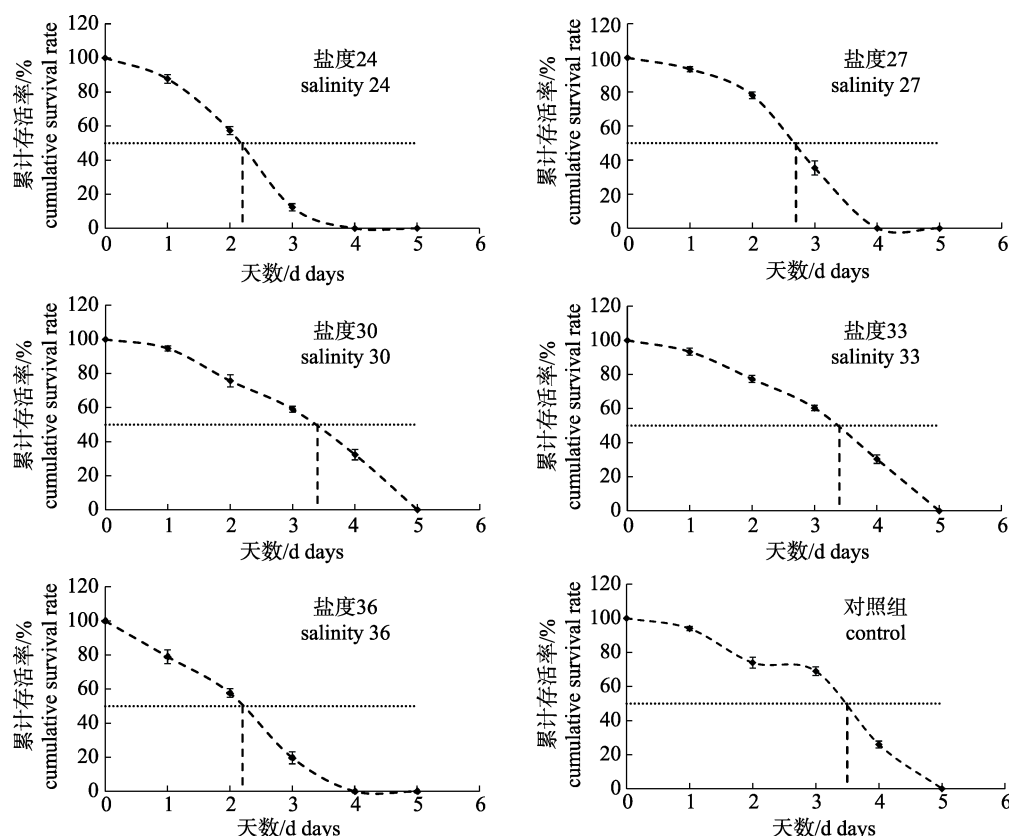


图 3 不同盐度条件下杂交石斑鱼初孵仔鱼累积存活率

Fig. 3 Cumulative survival rate of newly hatched larvae of hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀×*E. polyphkadion* ♂) under different salinity

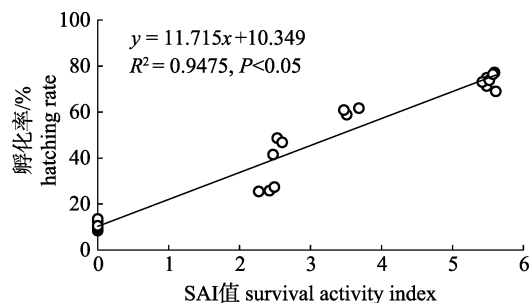


图 4 杂交石斑鱼 SAI 值与孵化率的相关性

Fig. 4 The relationship between the survival activity index (SAI) and hatching rate of hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀×*E. polyphkadion* ♂) larvae

根据盐度与孵化率的回归方程(图 1)求得孵化率最大时的盐度为 31.5, 根据盐度与畸形率的回归方程(图 2)求得畸形率最低时的盐度为 32.6。盐度 30 组、盐度 33 组与对照组相比孵化率最高, 畸形率最低, 组间无显著差异($P>0.05$)。综上所述认为, 杂交石斑鱼受精卵最适盐度范围为 30~33, 初孵仔鱼活力实验结果(表 5)也表明盐度 30~33 是最适盐度范围。有研究表明, 点带石斑鱼受精卵

孵化最适盐度范围为 30.5~32.5^[10], 赤点石斑鱼受精卵孵化的最适盐度为 27~35^[12], 七带石斑鱼受精卵孵化最适盐度为 30~35^[23]。这表明石斑鱼受精卵孵化最适盐度范围较高, 与其生态习性相吻合。石斑鱼多栖息于热带及亚热带海洋, 海水蒸发量大, 盐度较高, 故石斑鱼适宜在一定范围的高盐度环境中生活。有研究表明, 产卵前亲鱼性腺发育所处的条件决定胚胎发育的最适温度、盐度条件^[24], 孙丽华等^[17]对军曹鱼的研究也支持这一观点。因此, 选择石斑鱼人工催产时间要密切关注海区温度、盐度的波动。

3.2 盐度对卵黄囊仔鱼生长发育的影响

有研究表明, 低盐条件有利于仔鱼的生长^[25]。本研究表明, 杂交石斑鱼仔鱼卵黄囊容积在低盐条件下比高盐条件下要大。推测初孵仔鱼的渗透压调节机制发育尚不完善, 在低盐条件下, 仔鱼用于维持体内渗透压的稳定耗能减少; 而高盐条件下, 需要消耗更多的能量用于调节渗透压稳定。而卵黄囊仔鱼油球并不受盐度影响则反映在

卵黄囊仔鱼阶段先由卵黄囊提供营养物质, 然后是富含脂类的油球。这是因为卵黄囊主要成分是卵黄蛋白, 其营养转化效率高, 为初孵仔鱼提供关键的营养基础^[26], 也是初孵仔鱼发育过程中构建自身蛋白及酶的重要原料^[27]。这与条石鲷^[14]、点带石斑鱼^[10]中观察到的情况类似。高盐条件下, 杂交石斑鱼卵黄囊仔鱼全长变小, 可能与渗透脱水有关, 或是与高盐条件下用于渗透压调节耗能增多, 用于生长发育的能量相对减少有关^[10]。

3.3 盐度对仔鱼活力的影响

有资料表明, 海水鱼仔鱼活力和受精卵的卵质可以通过测定初孵仔鱼的不投饵存活系数(SAI)进行判断^[28]。王杰等^[15]进一步指出, SAI 值越低, 表明仔鱼的活力越差, 人工育苗的成活率相对较低。但 SAI 值的测定必须在适宜的环境条件下进行才能体现仔鱼活力^[29]。因此, 本研究受精卵在适宜温度(27℃)、盐度(自然海水 31)条件下进行孵化, 挑选正常活力好的初孵仔鱼用于不同盐度的 SAI 值的测定。结果表明, 盐度对杂交石斑鱼初孵仔鱼 SAI 值有显著影响($P<0.05$)。不同盐度下 SAI 值在 2.39~5.56, 仔鱼在盐度 24~36 能存活。盐度对初孵仔鱼 SAI 的影响主要是通过对渗透压的调节来实现的, 随着仔鱼发育, 逐渐完善主动调节渗透压系统以获得在较宽盐度范围存活的能力^[15]。杂交石斑鱼初孵仔鱼 SAI 值较低, 可能与亲鱼的营养状况、卵分批成熟和其他生态条件的变化有关。王涵生等^[12]通过测定 12 批赤点石斑鱼初孵仔鱼的 SAI 值, 并对 12 批仔鱼的培育进行追踪观察, 认为只有 SAI 值大于 5 的仔鱼才有可能被进一步培育成鱼苗。本研究中, 盐度 30 组、盐度 33 组及对照组观察到杂交石斑鱼初孵仔鱼 SAI 值大于 5, 而在杂交石斑鱼人工育苗实践中发现, 在温度 26~28℃, 盐度 24~27 条件下, 尽管初孵仔鱼 SAI 值小于 5, 采用室外高位池塘育苗模式也能成功培育获得鱼苗。至于杂交石斑鱼初孵仔鱼的 SAI 值与仔稚鱼进一步培育结果的相关性有待探讨。

有学者认为, 仔鱼的半致死时间即为仔鱼进入不可逆点的标志, 超过不可逆点, 即使投饵, 仔鱼也会因虚弱过度无法恢复摄食能力而死

亡^[12]。本研究通过比较杂交石斑鱼仔鱼在盐度 24~36 不同天数的存活率, 发现盐度 30 组、盐度 33 组及对照组中不投饵的半致死时间均为 3.5 d(图 3), 此值可初步确定为杂交石斑鱼仔鱼进入不可逆点的时间, 比军曹鱼仔鱼的 5~6 d^[17]短; 与赤点石斑鱼仔鱼的 3~4 d^[12]基本相近。在本研究中, 杂交石斑鱼在第 3 天仔鱼口裂形成, 仔鱼进入不可逆点的时间为 3.5 d, 这意味着仔鱼等待开口饵料出现的时间较短, 这是石斑鱼人工育苗成活率低下的一个重要原因。因此, 在生产中掌握仔鱼开口及不投饵半致死的时间, 及时在合适的时间内进行投饵, 对提高仔鱼成活率具有一定的实践意义。

探讨褐点石斑鱼♀×清水石斑鱼♂杂交子一代早期胚胎发育阶段适宜的环境因子, 可以为其人工育苗创建最优的培育环境提供科学依据。有学者指出, 若环境因子之间存在互作效应时, 对互作效应的分析比只分析因子主效应更重要、更有实际意义^[30]。因此, 还有待进一步探讨温度、pH、光照及氮氮等环境因子对杂交石斑鱼早期发育的影响及因子间是否存在互作效应, 以便更好地指导人工育苗。

参考文献:

- [1] Sun Y, Guo C Y, Wang D D, et al. Transcriptome analysis reveals the molecular mechanisms underlying growth superiority in a novel grouper hybrid (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀× *E. lanceolatus* ♂)[J]. BMC Genet, 2016, 17(1): 24–33.
- [2] Liufu Y Z, Zhao H H, Liu X C, et al. Preliminary study on the hybrid red-spotted grouper (*Epinephelus akaara*) ♂×Orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) ♀[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2007, 46(3): 72–75. [刘付永忠, 赵会宏, 刘晓春, 等. 赤点石斑鱼♂与斜带石斑鱼♀杂交初步研究[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2007, 46(3): 72–75.]
- [3] Wu S Q, Li J E, Ou Y J, et al. Allometric growth of hybrid grouper(*Epinephelus coioides* ♀× *E.lanceolatus* ♂)larvae and juveniles[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2014, 21(3): 503–510. [吴水清, 李加儿, 区又君, 等. 斜带石斑鱼(♀)×鞍带石斑鱼(♂)杂交子代仔、稚鱼的异速生长[J]. 中国水产科学, 2014, 21(3): 503–510.]
- [4] Yu H H, Li Y L, Chen C, et al. Feeding habits and growth characteristics of larval, juvenile, and young F₁ of *Epinephelus fuscoguttatus* (♀)×*E.lanceolatus* (♂)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2015, 22(5): 968–977. [于欢欢, 李炎璐, 陈超, 等. 棕点石斑鱼(♀)×鞍带石斑鱼(♂)杂交 F₁ 仔、稚、

- 幼鱼的摄食与生长特性分析[J]. 中国水产科学, 2015, 22(5): 968-977.]
- [5] Li Y L, Wang Q Y, Chen C, et al. Embryonic and morphological development in larva, juvenile, and young stages of *F₁* by *Epinephelus moara* (♀)×*E.septemfasciatus* (♂)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2012, 19(5): 821-832. [李炎璐, 王清印, 陈超, 等. 云纹石斑鱼(♀)×七带石斑鱼(♂)杂交子一代胚胎发育及仔稚幼鱼形态学观察[J]. 中国水产科学, 2012, 19(5): 821-832.]
- [6] Yang Q H, Huang Z C, Zheng L Y, et al. Embryonic development and growth of hybrid from the hybridization of *Epinephelus moara* (♀)×*E. akaara* (♂)[J]. Marine Fisheries, 2014, 36(3): 224-231. [杨求华, 黄种持, 郑乐云, 等. 云纹石斑鱼(♀)×赤点石斑鱼(♂)杂交子一代胚胎发育及生长[J]. 海洋渔业, 2014, 36(3): 224-231.]
- [7] Wu S Q, Zheng L X, Huang Z C, et al. Embryonic and morphological development in larva, juvenile, and young stages of hybrid grouper (*E. pinophelus moara* ♀×*E. lanceolatus* ♂)[J]. Journal of Fisheries Research, 2016, 38(1): 27-35. [吴水清, 郑乐云, 黄种持, 等. 云纹石斑鱼(♀)×鞍带石斑鱼(♂)杂交子一代胚胎发育及仔稚幼鱼形态观察[J]. 渔业研究, 2016, 38(1): 27-35.]
- [8] James C, Al-Thobaiti S, Rasem B, et al. Potential of grouper hybrid (*Epinephelus fuscoguttatus* × *E. polyphkadion*) for Aquaculture[J]. Naga, 1999, 22(1): 19-23.
- [9] Mai X J, Huang W J, Ye F L, et al. Reproduction Biology and Artificial Breeding of Marine Fish[M]. Beijing: China Ocean Press, 2005. [麦贤杰, 黄伟健, 叶富良, 等. 海水鱼类繁殖生物学和人工繁育[M]. 北京: 海洋出版社, 2005.]
- [10] Shi Z H, Chen B, Peng S M, et al. The morphological change under salinity stress in development of yolk sac larvae of *Epinephelus malabaricus*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2008, 39(3): 222-227. [施兆鸿, 陈波, 彭士明, 等. 盐度胁迫下点带石斑鱼(*Epinephelus malabaricus*)胚胎及卵黄囊仔鱼的形态变化[J]. 海洋与湖沼, 2008, 39(3): 222-227.]
- [11] Zhang H F, Liu X C, Wang Y X, et al. Effects of temperature, salinity and pH on hatch and larval activity of *Epinephelus coioides*[J]. Journal of Tropical Oceanography, 2006, 25(2): 31-36. [张海发, 刘晓春, 王云新, 等. 温度、盐度及pH对斜带石斑鱼受精卵孵化和仔鱼活力的影响[J]. 热带海洋学报, 2006, 25(2): 31-36.]
- [12] Wang H S, Fang Q S, Zheng L Y. Effects of salinity on hatching rates and survival activity index of the larvae of *Epinephelus akaara*[J]. Journal of Fisheries of China, 2002, 26(4): 344-350. [王涵生, 方琼珊, 郑乐云. 盐度对赤点石斑鱼受精卵发育的影响及仔鱼活力的判断[J]. 水产学报, 2002, 26(4): 344-350.]
- [13] Xie M J, Qu Y J, Wen J F, et al. Salinity tolerance of fertilized egg and larva of *Eleutheronema tetradactylum*[J]. Chinese Journal of Ecology, 2016, 35(5): 1263-1267. [谢木娇, 区又君, 温久福, 等. 四指马鲛(*Eleutheronema tetradactylum*)受精卵和仔鱼对不同盐度的耐受性[J]. 生态学杂志, 2016, 35(5): 1263-1267.]
- [14] Shi Z H, Peng S M, Yin Y Q, et al. Morphological changes of embryo and yolk sac larvae of barred knifejaw (*Oplegnathus fasciatus*) under salinity stress[J]. Chinese Journal of Ecology, 2009, 28(3): 471-476. [施兆鸿, 彭士明, 尹彦强, 等. 不同盐度下条石鲷胚胎及卵黄囊仔鱼的形态变化[J]. 生态学杂志, 2009, 28(3): 471-476.]
- [15] Wang J, Li B, Zhang C F, et al. Progress in research on the effects of salinity on embryonic and larval development of fish[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2012, 40(5): 187-192. [王杰, 李冰, 张成锋, 等. 盐度对鱼类胚胎及仔鱼发育影响的研究进展[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(5): 187-192.]
- [16] Guan J, Liu X Z, Lan C Y, et al. Effects of temperature and salinity on embryo development and larva survival in cross-breed *F₁* of *Paralichthys olivaceus* (♀)×*Paralichthys dentatus* (♂)[J]. Marine Fisheries Research, 2007, 28(3): 31-37. [关键, 柳学周, 兰春燕, 等. 温度、盐度对褐牙鲆(♀)×犬齿牙鲆(♂)杂交子一代胚胎发育和仔鱼存活的影响[J]. 海洋水产研究, 2007, 28(3): 31-37.]
- [17] Sun L H, Chen H R, Wang Z D. Effect of salinity on embryonic and larval development of cobia(*Rachycentron canadum*)[J]. Ecological Science, 2006, 25(1): 48-51. [孙丽华, 陈浩如, 王肇鼎. 盐度对军曹鱼胚胎和仔鱼发育的影响[J]. 生态科学, 2006, 25(1): 48-51.]
- [18] Xu X J, Li J E, Ou Y J. Effects of salinity on embryonic development and early larvae in ovate pompano *Trachinotus ovatus*[J]. South China Fisheries Science, 2009, 5(6): 31-35. [许晓娟, 李加儿, 区又君. 盐度对卵形鲳鲹胚胎发育和早期仔鱼的影响[J]. 南方水产科学, 2009, 5(6): 31-35.]
- [19] Feng G P, Zhuang P, Zhang L Z, et al. Embryonic and pre-larval development of *Tridentiger trigonocephalus* and adaptability to salinity[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2009, 33(2): 170-176. [冯广朋, 庄平, 章龙珍, 等. 长江口纹缟虾虎鱼胚胎发育及早期仔鱼生长与盐度的关系[J]. 水生生物学报, 2009, 33(2): 170-176.]
- [20] Shi Z H, Xia L J, Wang J G, et al. Effect of salinity on embryonic development and larval growth of *Dentex tumifrons* (Temminck et Schlegel)[J]. Journal of Fisheries of China, 2004, 28(5): 599-602. [施兆鸿, 夏连军, 王建钢, 等. 盐度对黄鲷胚胎发育及早期仔鱼生长的影响[J]. 水产学报, 2004, 28(5): 599-602.]
- [21] Zhang X L, Chen S Q, Liu S T, et al. Effects of temperature and salinity on embryonic development of Tongue sole, *Cynoglossus semilaevis* Gunther[J]. Advances in Marine Science, 2006, 24(3): 342-348. [张鑫磊, 陈四清, 刘寿堂, 等. 温度、盐度对半滑舌鲷胚胎发育的影响[J]. 海洋科学进展, 2006, 24(3): 342-348.]
- [22] Hassell K, Coutin P, Nugegoda D. Hypoxia, low salinity and lowered temperature reduce embryo survival and hatch rates in black bream *Acanthopagrus butcheri* (Munro, 1949)[J]. J Fish Biol, 2008, 72(7): 1623-1636.
- [23] Zhao M, Chen C, Liu X Z, et al. Effect of salinity on embryonic development and post-embryonic larval growth of *Epinephelus septemfasciatus*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2011, 32(2): 16-21. [赵明, 陈超, 柳学周, 等. 盐度对七带石斑鱼胚胎发育和卵黄囊仔鱼生长的影响[J]. 渔业科学

- 进展, 2011, 32(2): 16–21.]
- [24] Wang H S. Effects of salinity on egg development and growth, larval and juvenile survival rate of *Pagrosomus major*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2002, 9(1): 33–37. [王涵生. 盐度对真鲷受精卵发育及仔稚鱼生长的影响[J]. 中国水产科学, 2002, 9(1): 33–37.]
- [25] Varsamos S, Wendelaar Bonga S E, Charmantier G, et al. Drinking and Na^+/K^+ ATPase activity during early development of European sea bass, *Dicentrarchus labrax*: Ontogeny and short-term regulation following acute salinity changes[J]. J Exp Mar Biol Ecol, 2004, 311(2): 189–200.
- [26] Ambardekar A A, Reigh R C, Williams M B. Absorption of amino acids from intact dietary proteins and purified amino acid supplements follows different time-courses in channel catfish (*Ictalurus punctatus*)[J]. Aquaculture, 2009, 291(3–4): 179–187.
- [27] Concei O L, Van der Meeren T, Verreth J, et al. Amino acid metabolism and protein turnover in larval turbot (*Scophthalmus maximus*) fed natural zooplankton or Artemia[J]. Mar Biol, 1997, 129(2): 255–265.
- [28] Jaworski A, Kamler E. Development of a bioenergetics model for fish embryos and larvae during the yolk feeding period[J]. J Fish Biol, 2002, 60(4): 785–809.
- [29] Qiang J, Wang H, Li R W. Effect of salinity on hatching rate and larval vitality in hybrid tilapia[J]. Fisheries Science, 2009, 28(6): 329–332. [强俊, 王辉, 李瑞伟. 盐度对奥尼罗非鱼受精卵孵化和仔鱼活力的影响[J]. 水产科学, 2009, 28(6): 329–332.]
- [30] Montgomery D C. Design and Analysis of Experiments[M]. New York: John Wiley & Sons, 2008.

Effects of salinity on fertilized eggs hatch, morphology and survival activity of yolk sac larvae of hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus polyphekadion* ♂)

HUANG Jiansheng¹, CHEN Gang^{1,2,3}, ZHANG Jiandong¹, WANG Zhongliang^{1,2,3}, TANG Baogui^{1,2,3}, ZHOU Hui¹

1. Fishery College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China;

2. Guangdong Province Key Laboratory of Pathogen Biology and Epidemiology of Aquatic Economic Animals, Zhanjiang 524025, China;

3. Guangdong Regular Higher Education Institutions of Key Laboratory of Aquaculture in South China Sea for Aquatic Economical Animal, Zhanjiang 524025, China

Abstract: Hybridization is the most effective thus widely used technique in the artificial breeding of grouper. Salinity is one of the most crucial environmental variables affecting embryonic development in marine fishes. To study the effect of salinity on fertilized eggs of the hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *E. polyphekadion* ♂) in terms of egg diameter, hatching rate, morphology and survival of the yolk-sac larvae, fertilized eggs were reared in seawater with different salinities, and the effects on total egg diameter, oil globule diameter, hatching rate, abnormality rate, as well as the morphology and survival of the yolk-sac larvae, were observed. The diameter of the fertilized eggs increased with decreases in salinity, whereas the diameter of the oil globule appeared unaffected by the choice of salinity in the test range. Larvae hatched out in the salinity range 18 to 36, but the rates of hatching and abnormalities were significantly affected by salinity level ($P < 0.05$). With increases in salinity, the hatching rate first increased at a salinity up to 75.5‰, and then decreased at salinity of 30, whereas the rate of abnormalities followed an opposite pattern. The yolk sac was almost completely absorbed within 3 days of hatching at a salinity between 24 and 36, and there was no significant difference between the groups. Within the same salinity range, the survival activity index (SAI) of newly hatched larvae first increased and then decreased with increases in salinity. The newly hatched larvae had an SAI greater than 5; by 5 days after hatching they were starved to death, with half the deaths at 3.5 days after hatching. The fertilized eggs of this hybrid grouper can be hatched out in a salinity range of 24–36, with the optimal salinity at 30–33.

Key words: *Epinephelus fuscoguttatus*; *Epinephelus polyphekadion*; hybrid; hatching rate; yolk sac larvae; salinity

Corresponding author: CHEN Gang. E-mail: cheng@gdou.edu.cn