

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.00847

温度和盐度对吉富品系尼罗罗非鱼受精率和孵化率的联合影响

彭俊¹, 王辉¹, 强俊¹, 李瑞伟², 王海贞¹

1. 广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524025;

2. 广东省茂名市茂南三高良种繁殖基地, 广东 茂名 525024

摘要: 采用中心复合设计和响应曲面方法研究了温度(T , $^{\circ}\text{C}$)和盐度(S)对吉富品系尼罗罗非鱼人工受精率(FR, %)和孵化率(HR, %)的综合影响。设定的温度范围为 20~34 $^{\circ}\text{C}$, 盐度范围为 0~18。建立了温度、盐度与受精和孵化之间关系的定量模型, 并通过分析明确了温度与盐度的最优组合。结果表明, 吉富罗非鱼在温度与盐度较高或较低范围内受精率与孵化率都处于较低水平。温度和盐度的一次与二次效应对受精与孵化均有极显著的影响($P<0.01$)。温度与盐度二者间协同效应不显著($P>0.05$)。建立了吉富罗非鱼受精率与孵化率的多项式方程, 复相关系数分别达到了 0.957 8 和 0.960 1 ($P<0.01$), 可以用于预测吉富罗非鱼的受精率和孵化率。利用统计优化技术明确, 在温度 27.14 $^{\circ}\text{C}$, 盐度 8.95 时, 罗非鱼最佳的受精率为 80.81%, 孵化率为 77.63%。本研究旨在考察温度与盐度同时变化对吉富罗非鱼受精率与孵化率的影响, 探讨最佳温度-盐度组合以增加吉富罗非鱼苗种产量。

关键词: 吉富罗非鱼; 受精; 孵化; 中心复合设计(CCD); 温度; 盐度; 优化组合

中图分类号: S96

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)04-0847-10

罗非鱼(*Tilapia*)是鲈形目(Perciformes)、鲈形亚目(Percoidei)、丽鱼科(Cichlidae)的热带性鱼类, 原产非洲大陆, 是联合国粮农组织向全世界推广的优良品种, 现已成为世界性的主要养殖鱼类之一。尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)吉富品系(Genetically Improved Farmed Tilapia, GIFT)由国际水生生物资源管理中心(ICLARM)经混合杂交选育而成, 该品种具有生长速度快、出肉率高、遗传性状稳定等优点, 1994 年从菲律宾引入中国, 目前已成为中国大陆罗非鱼养殖的主要品种之一。中国南方地区是罗非鱼养殖的集中区域, 具有巨大的罗非鱼养殖开发潜力和有利条件, 仅广东省 2007 年罗非鱼产量占全国总量的 52.4%, 出口量及出口额分别约占全球总出口量和总出口额的 50%和 70%^[1]。

Rothbard 和 Pruginin^[2] 于 1975 年分别同时

进行了尼罗罗非鱼和奥利亚罗非鱼的人工授精和人工孵化研究, 介绍了如何进行人工授精及人工孵化, 但没有详细论述孵化过程中的适宜环境条件。水温、盐度、pH 值、溶氧、光照及遗传变异等, 都会对鱼类卵的受精率, 受精卵的孵化率产生不同程度的影响^[3-7]。从苗种生产角度来讲, 无疑较高的受精率和孵化率是提高罗非鱼苗种产量的重要保证, 因此如何在众多的影响因素中找出较为重要的影响因子就显得十分必要。

在诸多影响条件中, 温度和盐度是影响鱼类受精、孵化及种苗培育的最关键、最直接的因子。目前对罗非鱼繁育和生长环境生态学的研究, 主要偏重于对温度或盐度单因子效应的考察上。如 Rana^[8-9]和 Rougeot 等^[10]研究了温度对尼罗罗非鱼胚胎发育的影响; Suresh 等^[11]和 Villegas^[12]报道了盐度对罗非鱼受精卵的孵化及仔鱼生长和发育

收稿日期: 2010-09-25; 修订日期: 2010-11-18.

作者简介: 彭俊(1985-), 男, 硕士研究生, 研究方向为鱼类遗传育种. E-mail: jamalpj29@126.com

通信作者: 王辉(1966-), 男, 教授, 研究方向: 水产经济动物遗传育种及健康养殖. E-mail: whh524@sina.com

有一定的影响;强俊等^[13-14]分别研究了温度和盐度对奥尼罗非鱼受精卵孵化和仔鱼活力的影响。以上研究仅考虑了单因子对罗非鱼受精和孵化的影响,忽略了温度和盐度 2 个环境因子的协同影响作用。Likongwe 等^[15]通过正交实验研究了温度和盐度联合对尼罗罗非鱼幼鱼生长及饲料利用率的影响;林苑春等^[16]采用两因素交叉分组的方法研究了温度对尼罗罗非鱼急性耐盐性的影响,但温度和盐度联合效应对罗非鱼受精和孵化的影响尚未见报道。本实验采用响应曲面法,研究不同温度和盐度组合下对尼罗罗非鱼受精率及孵化率的综合影响,以期明确在适宜的温度和盐度组合下最佳的受精率及孵化率,为罗非鱼苗种生产提供理论依据。

响应曲面法(response surface methodology, RSM)是一种多变量建模型方法,这种建模方法通过与适当的实验设计结合可以综合分析 2 个或者 2 个以上试验因子和影响效应之间的定量关系,还可以通过优化数学统计的方法寻找最优实验因子组合,该方法目前已广泛地应用于农业、生物、医药、制造等领域^[17-20]。利用响应曲面法研究环境因子对罗非鱼人工受精和人工孵化的研究目前尚未见报道,本研究采用该方法探求温度和盐度对吉富品系尼罗罗非鱼受精率和孵化率的协同影响,探索最佳的温度和盐度组合,不但可以加强环境因子对罗非鱼人工受精和人工孵化领域的理论,也使响应曲面法在罗非鱼人工繁殖领域得以应用。同时希望通过本实验建立起相应的研究模型,使响应曲面法得以应用到其他各种鱼类的人工繁殖和养殖研究领域中去。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用亲鱼为吉富品系尼罗罗非鱼,为从世界渔业中心引进并自行改良成功的新一代吉富罗非鱼。2 龄亲鱼来自茂名市茂南三高良种繁殖基地,雌鱼 20 尾,雄鱼 20 尾,体质量($1\,070\pm 280$) g,体长(30.0 ± 3.2) cm。亲鱼放于网箱(长 10 m×宽 2 m×网高 2 m)暂养,每天投喂人工配合饲料(含粗

蛋白质为 28.0%、粗纤维 15.0%、粗脂肪 1.0%、粗灰分 17%、水分 12.0%、钙 4.5%、有效赖氨酸 1.0%等)2 次,投喂时间分别为 9 00 和 17 00,投喂量为亲鱼体质量的 3%。

1.2 人工授精

人工授精时,选择性腺发育良好的亲鱼,雌雄比为 1 1。采用腹部挤压法,将精液和卵子分别挤入两个小塑料盆中,用羽毛充分搅拌均匀后,快速取精子和卵子同时放入有少量水(水温及盐度均为各实验组合)的小塑料盆中,用羽毛搅动 1 min,再加入适量的水,静置 3 min 后,清洗 2~3 次,倒去盆中的水,然后将卵放入 1 000 mL 有网筛(筛目规格为 40 目)的烧杯中(各烧杯中盛有 900 mL 不同温度和盐度组合的水),烧杯置于各预设温度的孵化水槽(40 cm×30 cm×15 cm)中,每组(400 ± 10)粒卵,微充气,使卵充分翻滚。从放入卵开始,每小时取 10 粒卵于显微镜(4×10 倍)下观察,当观察到卵处于 4~8 细胞期时^[21](受精后 4~8 h),随机取各试验组合中 100 粒卵观察受精率,重复 2 次,并记录各组合受精率(FR)。受精率由下式计算:受精率(FR%)=受精卵数/总卵数×100%。

1.3 孵化

采用上述人工授精方法,将罗非鱼精子与卵子同时挤入温度为 27℃,盐度为 9 的小塑料盆中进行授精,获得受精卵。挑选已受精的卵置于 1 000 mL 的带有锥形网筛的预设温度和盐度的各试验组烧杯中,每组(200 ± 10)粒受精卵,微充气,使受精卵充分翻滚。待鱼孵化出膜后(由于条件不同,各实验组破膜时间不同,规定以 7 天后所有实验结束),计算孵化率(HR)。孵化率计算公式为:孵化率(HR%)=孵出鱼苗数/受精卵数×100%。

1.4 实验设计

通过罗非鱼的受精和孵化进行温度盐度的预试验,确定本实验中温度范围为 20~34℃;盐度范围为 0~18。温度利用电热棒(量程为 20~34℃)控制,盐度用曝气后的自来水添加海水晶调节得到。实验中保证温度变化不超过 0.2℃,盐度变化不超过 0.2。实验中同时测得其他因素为 pH(7.8±0.1),DO (4.5 ± 0.2) mg/L,光照 12L 12D,NO₃⁻-N

和 $\text{NO}_2^+ \text{-N}$ 分别不超过 0.04 mg/L 和 0.02 mg/L。

实验中温度和盐度分别以 T 、 S 表示, 采用 2 因素 5 水平的中心复合设计(central composite design, CCD)方法。每个因子的编码分别为 -1.2671 、 -1 、 0 、 1 、 1.2671 。整个实验包括 13 个实验点(4 个因子点, 4 个轴点和 5 个中心点)。实验重复 1 次, 共计 26 个组合, 各实验点的次序随机安排。因子组合及相应实验结果列于表 1。

1.5 统计方法

实验采用 CCD 设计, 以温度和盐度 2 个因子为自变量, 以罗非鱼的受精率 FR, 孵化率 HR 为因变量, 建立的受精率和孵化率的二次回归方程模型为:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 T + \beta_2 S + \beta_3 T^2 + \beta_4 S^2 + \beta_5 T \times S + \varepsilon;$$

其中, Y 为响应变量(受精率或孵化率); β_0 为常数项, β_1 、 β_2 、.....、 β_5 为回归系数; T 、 T^2 为温

表 1 罗非鱼受精率和孵化率的实验设计及结果
Tab.1 Experimental design for tilapia fertilization and hatching rates and results

序号 no.	编码 coded		实际 actual		受精率/% FR(±SD)	孵化率/% HR(±SD)
	$T/$	S	$T/$	S		
1	0	0	27.0	9.0	82.52(±1.20)	78.78(±1.10)
2	$-\alpha$	0	20.0	9.0	4.14(±0.02)	1.87(±0.01)
3	0	0	27.0	9.0	82.77(±1.60)	79.55(±1.30)
4	-1	1	21.5	16.1	7.14(±0.30)	4.90(±0.30)
5	-1	-1	21.5	1.9	9.88(±0.35)	6.32(±0.15)
6	0	0	27.0	9.0	85.00(±1.30)	82.47(±1.45)
7	0	α	27.0	18.0	12.51(±0.42)	11.33(±0.33)
8	0	0	27.0	9.0	82.73(±1.40)	79.09(±1.21)
9	1	1	32.5	16.1	13.64(±0.20)	7.87(±0.12)
10	1	-1	32.5	1.9	16.86(±0.15)	14.94(±0.10)
11	1	-1	32.5	1.9	14.80(±0.21)	13.26(±0.15)
12	-1	1	21.5	16.1	9.60(±0.04)	8.65(±0.05)
13	0	0	27.0	9.0	78.64(±0.85)	76.64(±0.95)
14	$-\alpha$	0	20.0	9.0	6.05(±0.05)	3.82(±0.06)
15	0	0	27.0	9.0	82.27(±1.15)	79.50(±1.35)
16	0	0	27.0	9.0	82.80(±1.60)	78.73(±1.72)
17	1	1	32.5	16.1	12.26(±0.55)	8.25(±0.35)
18	0	$-\alpha$	27.0	0.0	10.91(±0.15)	7.65(±0.05)
19	0	α	27.0	18.0	9.60(±0.65)	7.48(±0.08)
20	-1	-1	21.5	1.9	6.82(±0.02)	5.04(±0.01)
21	0	0	27.0	9.0	81.82(±1.48)	78.26(±0.76)
22	0	0	27.0	9.0	80.91(±0.95)	78.47(±1.28)
23	α	0	34.0	9.0	7.07(±0.03)	5.21(±0.04)
24	0	0	27.0	9.0	83.89(±1.68)	79.56(±1.80)
25	0	$-\alpha$	27.0	0.0	12.41(±0.08)	8.62(±0.05)
26	α	0	34.0	9.0	8.18(±0.05)	7.32(±0.12)

注: (1)| α |=1.267 1 为星号臂值, 中心点重复 5 次; (2)受精率与孵化率的实测值为重复 3 次计算结果, 以平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm \text{SD}$)表示; (3)由于在变换前后回归方程的系数几乎没有变化, 故本实验中没有对受精率和孵化率进行幂变换。
Note: (1)Axial or star points $|\alpha| = 1.2671$, central points were repeated five times for each experiment.(2)The observations of FR and HR were computed from 3 samplings for each temperature-salinity combination (denoted as $\bar{x} \pm \text{SD}$). (3)Due to little change in multiple coefficients before and after transformation, the raw data of FR and HR were not power-transformed.

度的一次和二次效应; S 、 S^2 为盐度一次和二次效应; $T \times S$ 为温度盐度的交互效应; ε 为随机误差。

采用 SAS(V8.2)对实验数据进行统计分析。由此建立影响因子与罗非鱼受精和孵化间的回归方程, 并给出相应的拟合度。对所建立的受精率和孵化率回归方程进行分析, 可得到最优的温度、盐度组合, 其结果可通过响应面图来清晰展示。采用显著性标准为 $P<0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 模型的建立及显著性检验

2.1.1 受精率 利用 SAS 统计软件对表 1 实验数据进行多元回归拟合, 得到受精率(FR)对温度(T)和盐度(S)的二次多项回归方程为: $FR(\%) = -953.568 + 71.704T + 13.665S - 1.318T^2 - 0.735S^2 - 0.018T \times S$;

对该模型进行方差分析, 结果见表 2; 回归模型系数显著性检验结果见表 3。

由表 2 可知, $P<0.001$ 表明受精率所建立的回归模型极显著。失拟项 $F=167.14$, $P<0.001$ 这表明

拟合的方程可能无效。但考虑到本实验中纯误差的均方很小($MS_{\varepsilon}=2.6$), 加之方程的决定系数 R^2 为 95.78%, 校正系数 R^2 为 94.73%, 这表明所拟合的二次方程合适。

由表 3 回归模型系数的显著性检验结果可知, 模型的一次项 T 、 S 对受精率的线性效应极显著 ($P<0.001$), 二次项 T^2 、 S^2 对受精率的效应极显著差异 ($P<0.001$)。交互项 $T \times S$ 交互效应不显著 ($P=0.806$)。回归方程各项的方差分析结果还表明, 各个具体试验因子与响应变量间都不存在简单的线性关系。

2.1.2 孵化率 对表 1 实验数据进行多元回归拟合, 得到孵化率 HR 对温度(T)和盐度(S)的二次多项回归模型为: $HR(\%) = -947.532 + 70.821T + 14.353S - 1.297T^2 - 0.733S^2 - 0.045T \times S$;

对方程进行方差分析和回归系数显著性检验, 结果见表 4 和表 5。

表 4 的结果表明, 孵化率所建立的回归模型是极显著的 ($P<0.001$)。虽然失拟误差极显著 ($P<$

表 2 温度和盐度对罗非鱼受精率影响的方差分析
Tab. 2 Analysis of variance for effects of temperature and salinity on tilapia fertilization rate

来源 source	自由度 degree of freedom	平方和 SS	SS	均方 MS	F	P
回归 regression	5	30941.2	30941.2	6188.2	90.89	<0.001
线性 linear	2	68.3	17619.5	8809.8	129.40	<0.001
平方 squared	2	30868.7	30868.7	15434.4	226.70	<0.001
交互作用 interaction	1	4.2	4.2	4.2	0.06	0.806
残差 residual	20	1361.6	1361.6	68.1		
失拟 lack of fit	3	1317.0	1317.0	439.0	167.14	<0.001
纯误差 pure error	17	44.6	44.6	2.6		
合计 total	25	32302.8				

注: 决定系数 $R^2=95.78\%$, 校正系数 $R^2=94.73\%$ 。
Note: $R^2=95.78\%$, adjusted $R^2=94.73\%$.

表 3 温度和盐度回归系数的显著性检验
Tab.3 Estimates and significance test for coefficients of temperature and salinity in the regression equation established for fertilization rates

参数 parameter	回归系数 coefficient	系数标准误 SE of coefficients	t	P
常量 constant	-953.568	63.648	-14.982	<0.001
T	71.704	4.612	15.546	<0.001
S	13.665	2.228	6.134	<0.001
T^2	-1.318	0.084	-15.650	<0.001
S^2	-0.735	0.051	-14.439	<0.001
$T \times S$	-0.018	0.074	-0.249	0.806

表 4 温度和盐度对罗非鱼孵化率影响的方差分析

Tab.4 Analysis of variance for effects of temperature and salinity on hatching rate of tilapia

来源 source	自由度 degree of freedom	平方和 SS	均方 MS	F	P
回归 regression	5	30342.9	6068.6	96.29	<0.001
线性 linear	2	57.7	8707.2	138.15	<0.001
平方 squared	2	30259.7	15129.8	240.06	<0.001
交互作用 interaction	1	25.5	25.5	0.4	0.532
残差 residual	20	1260.5	63.0		
失拟 lack of fit	3	1219.8	406.6	169.98	<0.001
纯误差 pure error	17	40.7	2.4		
合计 total	25	31603.4			

注: 决定系数 $R^2=96.01\%$, 校正系数 $R^2=95.01\%$.
Note: $R^2=96.01\%$, adjusted $R^2=95.01\%$.

0.001), 这是由极小的纯误差均方($MS=2.4$)造成。此外, 孵化率对温度和盐度的回归方程决定系数 R^2 为 96.01% , 校正决定系数 R^2 为 95.01% , 说明所建立的方程与实际数据拟合良好, 因此可用该回归方程进行下一步的优化分析。

从表 5 可见, 温度和盐度的一次项 T 、 S , 二次项 T^2 、 S^2 对孵化率均有极显著影响($P<0.001$); 温度与盐度的交互作用不显著($P=0.532$), 温度、盐度对孵化率的影响不呈简单的线性方式。

2.2 响应曲面

2.2.1 受精率 为了直观考察温度和盐度 2 个因素及其交互作用同时对受精率的影响, 实验中其他因素条件保持不变, 获得 2 个因素及其交互作用对受精率影响的二次方程, 并得到一组响应曲面及其等高线图(图 1), 从而确定因素的最佳水平范围。该组图形直观地反映了温度和盐度对受精率的影响。曲面的形状可反映出影响因素的显著水平, 曲面较陡说明影响显著, 曲面平缓则说明影响不显著; 等高线的形状可反映出交互效应的

强弱趋势, 椭圆表示两因素交互作用显著, 而圆形则于之相反。由图 1 可以清晰地看出, 温度和盐度各自对受精率影响较大; 而温度和盐度的交互作用对受精率不明显。

2.2.2 孵化率 由图 2 可以看出, 温度和盐度对孵化率影响都较大, 而两者的交互作用对孵化率影响不显著, 这与表 5 中的结果基本一致。

2.3 优化

2.3.1 受精率 为了确定最佳试验点, 在试验设定的因子范围内选择出发点, 通过分析可得到: 在温度为 27.15°C , 盐度为 8.95, 最佳的受精率是 80.81% , 其可靠性达到 0.95(图 3)。

从图 3 可以知道, 罗非鱼受精率的适宜温度为 $26\sim 28^{\circ}\text{C}$, 适宜的盐度是 $6\sim 10.5$ 。

2.3.2 孵化率 经优化得到吉富品系罗非鱼最佳孵化率为 77.64% , 其所需条件温度为 27.14°C , 盐度为 8.95, 可靠性达到 0.94(图 4)。

从图 4 可以知道, 罗非鱼孵化率的适宜温度为 $26\sim 28^{\circ}\text{C}$, 适宜的盐度是 $6.3\sim 10.5$ 。

表 5 温度和盐度对罗非鱼孵化率影响回归模型系数的显著性检验

Tab. 5 Estimates and significance test for the coefficients of temperature and salinity in the regression derived on the hatching rates of tilapia

参数 parameter	回归系数 coefficient	系数标准误 SE of coefficients	t	P
常量 constant	-947.532	61.2384	-15.473	<0.001
T	70.821	4.4378	15.959	<0.001
S	14.353	2.1435	6.696	<0.001
T^2	-1.297	0.0810	-16.016	<0.001
S^2	-0.733	0.0490	-14.954	<0.001
$T\times S$	-0.045	0.0715	-0.636	0.532

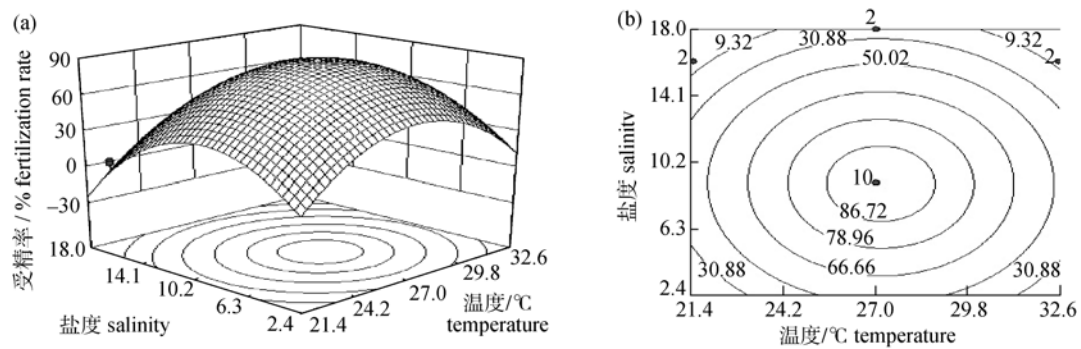


图 1 温度和盐度对罗非鱼受精率的响应曲面图(a)和等高线图(b)

Fig.1 Response surface (a) and contour plot (b) of effects of temperature and salinity on the fertilization rate of Nile Tilapia

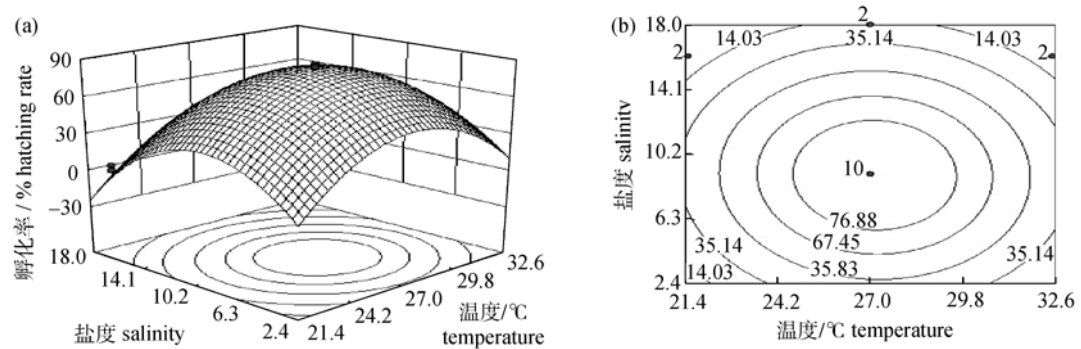


图 2 温度和盐度对罗非鱼孵化率的响应曲面图(a)和等高线图(b)

Fig.2 Response surface(a) and contour plot(b) of effects of temperature and salinity on the hatching rate of Nile Tilapia

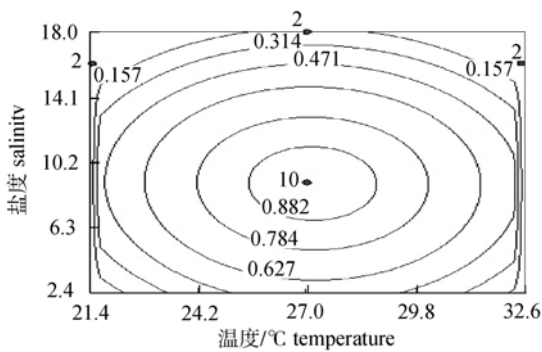


图 3 温度和盐度对罗非鱼受精率可靠性函数优化影响的等高线图

Fig.3 Contour plot of the desirability function optimization for effects of temperature and salinity on the fertilization rate of Nile Tilapia

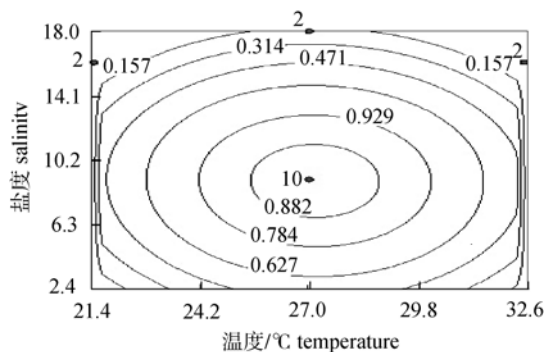


图 4 温度和盐度对罗非鱼孵化率可靠性函数优化影响的等高线图

Fig.4 Contour plot of the desirability function optimization for effects of temperature and salinity on the hatching rate of Nile Tilapia

3 讨论

温度和盐度是鱼类生活水环境中的 2 个最直接的重要因子, 直接影响鱼类的生存、生长和繁殖。不同鱼类受精和胚胎发育要求的温度和盐度条件不同, 对温度和盐度的适应范围也有很大差

异。实验结果显示, 温度和盐度的一次项对尼罗罗非鱼的受精率和孵化率有显著的影响(表 3、表 5)。从图 1 可知, 当温度高于 31.5 或低于 22 , 罗非鱼受精率不足 50%。尼罗罗非鱼在温度为 24~30 , 孵化率均达 90%^[8]; 本实验罗非鱼孵化

适宜温度为 25~29.8℃(图 2), 结果与之基本一致; 温度高于或低于适宜温度, 其孵化率都显著降低。孵化率对温度和盐度的要求略窄于受精率, 这是由于不同生长阶段的罗非鱼对温度的适应范围有很大的差异^[15,22-23], 胚胎发育的适宜温度比其他各个生长阶段要窄很多。高盐及低盐对受精率和孵化率均有显著影响。本实验盐度在 2.4~14.5 时受精率高于 50% (图 1), 说明精子和卵子在此盐度下活力最佳; 而 Chao 等^[24]研究得到尼罗罗非鱼精子活力最大的盐度为 0~5。从图 2 可知当盐度在 4~14.2 时孵化率高于 50%, 孵化率的盐度范围明显比受精率要窄, 这是渗透调节的能力和机理随着胚胎的发育在不断变化而引起的。有研究表明: 尼罗罗非鱼的胚胎在盐度高于 15 时孵化率较低, 盐度在 0~10 时孵化率均达到 82%以上^[25-26], 本实验结果与之有所差异: 在盐度小于 4 时, 孵化率较低。强俊等^[14]研究发现, 奥尼罗非鱼的适宜孵化盐度为 5~14, 本实验吉富品系尼罗罗非鱼适宜的孵化盐度为 6.3~10.5, 其适宜范围较小。

温度和盐度各自的二次效应对尼罗罗非鱼的受精率和孵化率有极显著影响(表 3、表 5)。说明温度和盐度对尼罗罗非鱼的受精率和孵化率存在峰值, 其对实际生产有重要意义。温度影响酶的活力进而影响新陈代谢和生长发育, 盐度对渗透压有调节作用。当温度升高或降低时, 受精卵的渗透压也会随着改变, 对盐度的要求也会改变。但实验表明, 温度和盐度对受精率和孵化率的交互作用不显著(表 3、表 5)。

鱼类受精时主要是精子与卵子间的相互作用。顶体酶是精子头部一种特殊的酶, 为丝氨酸蛋白酶, 是受精过程中的一种重要的蛋白水解酶, 此酶能水解卵细胞的透明带, 使得精卵能相互融合。顶体酶还能够促进生殖系统中的激肽的释放, 后者能够增强精子的活力和促进精子的运动^[27]。顶体酶活力受精子数目、孵育温度、精浆、pH 及离子浓度等因子的影响。据研究匙吻鲟(*Polyodon spathula*)精子顶体酶活力存在季节变化^[28]。本实验受精率与 Chao 等^[24]所得受精率有所不同, 可

能是由于实验时间不同, 即季节变化导致精子顶体酶活力不同; 也可能是不同品种的鱼精子、卵子质量差异等原因造成结果不同。

在鱼类和两栖动物中, 孵化都是借助于孵化酶(hatching enzyme)来完成的^[29-31], 孵化酶是胚胎中孵化腺细胞所分泌的特异性酶。鱼类的孵化过程包括孵化酶对卵壳的消化和胚胎通过肌肉运动使其从已被部分消化的卵壳中脱出 2 个阶段^[32]。温度是影响顶体酶及孵化酶分泌的重要因素之一。酶在适宜的温度下, 其活力最大; 但温度过高或过低, 均会降低酶的活力。从图 3、图 4 可知, 在温度盐度组合实验中, 随着温度的升高, 罗非鱼的受精率和孵化率都显著升高, 但当温度超过一定范围时(超过 28), 其受精率和孵化率又明显下降(两者均从 80%下降到接近 0)。鱼类卵的发育受渗透压梯度的调节机制影响, 盐度主要影响鱼类卵内渗透压的稳定性, 在适盐范围条件下卵内渗透压可通过自身调节保持在相对稳定水平, 故而就会有较高的孵化率, 适宜的盐度有利于维持卵适宜的渗透压, 能保证受精和孵化的顺利进行。在早期胚胎发育过程中, 渗透调节是有积极意义的, 调节主要归因于细胞质膜的半渗透性和胚盘细胞的紧密连接^[33]。

通常采用的单因子和正交实验无法找到整个区域上各个因素的最佳组合及响应值的最优值比较, 响应曲面法与之比较, RSM 试验次数少、周期短, 求得的回归方程精确度高, 又能研究几个因素间交互协同作用, 是降低开发成本、优化加工条件、提高产品质量、解决生产过程中实际问题的一种有效办法, 目前得到了广泛地应用^[15-18]。虽然已有模型建立, 并给出了响应曲面图或等高线图, 但实验设计方法及结果分析均无法与响应曲面法相比^[34-36]。本实验采用中心复合旋转设计, 通过二次回归设计的响应曲面分析法, 分别建立了受精率和孵化率对温度盐度的二次多项式数学回归模型, 不但找到了适宜的温度和盐度, 而且得到了最佳受精和孵化的温度和盐度值。

在实际生产中, 受精和孵化是一个连续的过

程,理论上在实验时应连续进行,而实验并未连续开展,却将其分别进行。因为在受精率的实验中,不同的温度盐度组合下,温度过高过低和盐度过高过低时受精率都极低,导致受精卵很少,无法进行温度盐度对罗非鱼孵化率的实验;因此对孵化实验选择在适宜温度盐度下重新进行人工受精,取受精卵进行孵化实验。虽然温度和盐度对罗非鱼受精率和孵化率是 2 个单独的实验,但通过如图 3 和图 4 所示的单独优化,受精率和孵化率的温度盐度基本一致,而孵化对环境因子的要求比受精更为严格,这也与实验所得结果一致(图 1、图 2);可以认为在温度为 27.14 ,盐度为 8.95,罗非鱼的最佳受精率是 80.81%,孵化率是 77.63%。在实际生产中,种苗繁殖企业力求获得最大的经济利益,希望寻求罗非鱼最大的受精率和孵化率。如建立适宜的配套设施,将温度和盐度控制在最佳范围是经济可行的,本实验为实际生产提供了有效的参考依据。

本实验只考察了温度和盐度对罗非鱼受精率和孵化率的影响,但在实际生产中,如 pH 值、溶氧、水流速度、密度及遗传变异等各种内外环境因子对罗非鱼繁殖也存在影响,因此需要进一步加强研究,更好地为实际生产提供科学依据。

参考文献:

- [1] 雷光英,曹俊明,万忠,等. 2008 年度广东省罗非鱼产业发展现状分析[J]. 广东农业科学, 2009(7): 240-243.
- [2] Rothbard S, Pruginin Y. Induced spawning and artificial incubation of tilapia[J]. Aquaculture, 1975, 5: 315-321.
- [3] Asoh K, Yoshikawa T. The role of temperature and embryo development time in the diel timing of spawning in a coral-reef damselfish with high-frequency spawning synchrony[J]. Envir Biol Fish, 2002, 64: 379-392.
- [4] Ridha M T, Cruz E M. Effect of different schedules for broodstock exchange on the seed production of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) in freshwater[J]. Aqu Intern, 2003, 11: 267-276.
- [5] Hilder M L, Pankhurst N W. Evidence that temperature change cues reproductive development in the spiny damselfish, *Acanthochromis polyacanthus*[J]. Envir Biol Fish, 2003, 66: 187-196.
- [6] Panini E B, Mylonas C C, Zanuy S, et al. Incubation of embryos and larvae of marine fish using microtiter plates[J]. Aqu Intern, 2001, 9: 189-195.
- [7] Zacharia S, Kakati V S. Optimal salinity and temperature for early developmental stages of *Penaeus merguensis* De man[J]. Aquaculture, 2004, 232: 373-382.
- [8] Rana K J. Influence of incubation temperature on *Oreochromis niloticus* (L) eggs and fry I. gross embryology, temperature tolerance and rates of embryonic development[J]. Aquaculture, 1990a, 87: 165-181.
- [9] Rana K J. Influence of incubation temperature on *Oreochromis niloticus* (L) eggs and fry II. Survival, growth and feeding of fry developing solely on their yolk reserves[J]. Aquaculture, 1990b, 87: 183-195.
- [10] Rougeot C, Prignon C, Ngouana Kengne C V, et al. Effect of high temperature during embryogenesis on the sex differentiation process in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*[J]. Aquaculture, 2008, 276: 205-208.
- [11] Suresh A V, Lin C K. Tilapia culture in saline waters : a review[J]. Aquaculture, 1992, 106: 201-226.
- [12] Villegas C T. Evaluation of the salinity tolerance of *Oreochromis mossambicus*, *O. niloticus* and their F₁ hybrids[J]. Aquaculture, 1990, 85: 281-292.
- [13] 强俊,李瑞伟,王辉. 温度对奥尼罗非鱼受精卵孵化和仔鱼活力的影响[J]. 淡水渔业, 2008, 38(4): 25-29.
- [14] 强俊,李瑞伟,王辉. 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.
- [15] Likongwe J S, Stecko T D, Stauffer J R, et al. Combined effects of water temperature and salinity on growth and feed utilization of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) [J]. Aquaculture, 1996, 146: 37-46.
- [16] 林苑春,叶富良,谭斌,等. 温度对尼罗罗非鱼急性耐盐性的影响[J]. 广东海洋大学学报, 2007, 27(4): 35-38.
- [17] Quintavalla S, Parolari G. Effects of temperature, aw and pH on the growth of *Bacillus* cells and spores: a response surface methodology study[J]. Intern J Food Microbiol, 1993, 19: 207-216.
- [18] Henriques A W S, Jessouroun E, Lima E L, et al. Capsular polysaccharide production by *Neisseria meningitidis* serogroup C: Optimization of process variables using response surface methodology[J]. Proc Biochem, 2006, 41: 1822-1828.
- [19] Prichard M N, Shipman C Jr. A three-dimensional model to analyze drug-drug interactions[J]. Antiviral Res, 1990, 14:

- 181–205.
- [20] Kim Y K, Jo Y S, Hong J P, et al. Approach to the shape optimization of racetrack type high temperature superconducting magnet using response surface methodology[J]. Cryogenics, 2001, 41: 39–47.
- [21] Poleo G A, Greg Lutz C, Cheuk G, et al. Fertilization by intracytoplasmic sperm injection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) eggs[J]. Aquaculture, 2005, 250: 82–94.
- [22] Baras E, Jacobs B, Me'lard C. Effect of water temperature on survival, growth and phenotypic sex of mixed (XX-XY) progenies of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*[J]. Aquaculture, 2001, 192: 187–199.
- [23] Azaza M S, Dhraef M N, Kraem M M. Effects of water temperature on growth and sex ratio of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) reared in geothermal waters in southern Tunisia[J]. J Therm Biol, 2008, 33: 98–105.
- [24] Chao N H, Chao W C, Liu K C, et al. The properties of tilapia sperm and its cryopreservation[J]. J Fish Biol, 1986, 30: 107–118.
- [25] Watanabe W O, Kuo C M, Huang M C. Salinity tolerance of Nile tilapia fry (*Oreochromis niloticus*), spawned and hatched at various salinities[J]. Aquaculture, 1985a, 48: 159–176.
- [26] Watanabe W O, Kuo C. Observations on the reproductive performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in laboratory aquaria at various salinities[J]. Aquaculture, 1985b, 49: 315–323.
- [27] Baba T, Kashiwabara S, Watanabe K, et al. Activation and maturation mechanisms of boar acrosin zymogen based on the deduced primary structure [J]. J Biochem, 1989, 264: 11 920–11 927.
- [28] Ciereszko A, Mims S D, Glogowski J, et al. Characteristics of sperm acrosin-like activity of paddlefish (*Polyodon spathula* Walbaum) [J]. Compar Biochem Physiol Part B, 2000, 125: 197–203.
- [29] Yamagami K. Mechanism of hatching in fish[M]. New York: Academic Press, 1988: 446–499.
- [30] 樊廷俊, 史振平. 鱼类孵化酶的研究进展及其应用前景[J]. 海洋湖沼通报, 2002(1): 48–56.
- [31] 樊廷俊, 片桐千明. 非洲爪蟾孵化酶的纯化及其部分生化特性研究[J]. 生物化学与生物物理学报, 1998, 30(1): 75–80.
- [32] Ishida J. Hatching enzyme: past, present and future[J]. Zoolog Sci, 1985(2): 1–10.
- [33] Swanson C. Early development of milkfish: Effects of salinity on embryonic and larval metabolism, yolk absorption and growth[J]. J Fish Biol, 1996, 48: 405–421.
- [34] Walsh W A, Swanson C, Lee C S. Combined effects of temperature and salinity on embryonic development and hatching of striped mullet, *Mugil cephalus*[J]. Aquaculture, 1991, 97: 281–289.
- [35] Mihelakakis A, Kitajima C. Effects of salinity and temperature on incubation period, hatching rate, and morphogenesis of the silver sea bream, *Sparus sarba* (ForskAl, 1775) [J]. Aquaculture, 1994, 126: 361–371.
- [36] Cook M A, Guthrie K M, Rust M B, et al. Effects of salinity and temperature during incubation on hatching and development of lingcod *Ophiodon elongatus* Girard, embryos[J]. Aqu Res, 2005, 36: 1298–1303.

Combined effect of temperature and salinity on the fertilization and hatching rate in the GIFT strain of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*

PENG Jun¹, WANG Hui¹, QIANG Jun¹, LI Ruiwei², WANG Haizhen¹

1. Fisheries College of Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China

2. Guangdong Maoming Sangao Tilapia Breeding Farm, Maoming 525024, China

Abstract: We evaluated the effect of temperature and salinity on the artificial fertilization rate (FR, %) and hatching rate (HR, %) in the GIFT strain of *Oreochromis niloticus* using a Central Composite Design and Response Surface method. The fish were reared in temperatures ranging from 20–34°C and the salinities ranging from 0–18. Both FR and HR decreased as temperature and salinity approached the lower and higher bounds. HR and FR were significantly affected by the linear and quadratic of temperature and salinity ($P < 0.001$). However, there was no evidence for a synergistic effect between temperature and salinity ($P > 0.05$). After correcting for the negative correlation coefficient, the r^2 values for the equations explaining temperature and salinity were 0.957 8 and 0.960 1, respectively ($P < 0.01$). Thus, these models can be used to forecast HR and FR in Nile tilapia. The highest FR (80.81%) and HR (77.63%) were observed eggs incubated at 27.14°C and 8.95 of salinity. Our results may be used to improve fertilization and hatching success in cultured strains of Nile tilapia.

Key words: GIFT strain; Nile tilapia; fertilization; hatching; central composite design (CCD); response surface; optimization

Corresponding author: WANG Hui . E-mail: whh524@sina.com.