

徐文刚, 唐永政, 张建柏, 征矢野清, 邹华锋. 外源人绒毛膜促性腺激素诱导黑边石斑鱼排卵的研究 [J]. 广东农业科学, 2020, 47(4): 122-128.

外源人绒毛膜促性腺激素诱导 黑边石斑鱼排卵的研究

徐文刚¹, 唐永政¹, 张建柏², 征矢野清³, 邹华锋⁴

(1. 烟台大学海洋学院, 山东 烟台 264005; 2. 烟台市海洋经济研究院, 山东 烟台 264003;

3. 长崎大学中国东海环境资源研究所, 日本 长崎 851-2213;

4. 上海海洋大学水产科学国家级实验教学示范中心 /

水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306)

摘要:【目的】了解外源人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, HCG) 诱导黑边石斑鱼 (*Epinephelus fasciatus*) 排卵的影响。【方法】以成熟的黑边石斑鱼为研究对象, 测量其体长、体质量和肥满度后, 在 2018 年 7—8 月, 使用 HCG 激素 (剂量为 200 IU/kg 或 500 IU/kg) 注射分别对 6 尾雌鱼进行成熟诱导。【结果】在 200 IU/kg HCG 处理中, 注射 24 h 前有 5 尾雌鱼的卵母细胞处于第三次卵黄球前期阶段; 注射 48 h 后 2 尾雌鱼出现核移动卵母细胞, 1 尾雌鱼的卵母细胞为第三次卵黄球后期阶段; 注射 60 h 后 1 尾雌鱼出现排卵现象, 其余 5 尾雌鱼均为第三次卵黄球后期阶段。在 200 IU/kg HCG 处理的排卵个体中, 注射时其卵母细胞直径为 477.0 μm , 注射后 60 h 卵母细胞的直径增加至 624.4 μm 。此外, 经催产、排卵、受精和孵化后共获得总卵数 16 906 粒, 受精率为 68.7%, 孵化率为 43.0%。而 500 IU/kg HCG 处理的黑边石斑鱼排卵失败。【结论】使用剂量为 200 IU/kg 的外源 HCG 激素可诱导黑边石斑鱼成熟且排卵, 但为了提高排卵率、受精率和孵化率, 其注射剂量和效应时间还需要进一步调节

关键词: 黑边石斑鱼; HCG 激素; 排卵; 受精; 孵化

中图分类号: S965.3

文献标志码: A

文章编号: 1004-874X (2020) 04-0122-07

Study on the Ovulation of *Epinephelus fasciatus* Induced by Exogenous Human Chorionic Gonadotrophin Hormone

XU Wengang¹, TANG Yongzheng¹, ZHANG Jianbai², SOYANO Kiyoshi³, ZOU Huaifeng⁴

(1. School of Ocean, Yantai University, Yantai 264005, China;

2. Yantai Institute of Marine Economy, Yantai 264003, China;

3. Institute for East China Sea Research, Organization for Marine Science and Technology, Nagasaki University, Nagasaki 851-2213, Japan; 4. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education/

Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources,

Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract:【Objective】This study aimed to understand the effects of exogenous human chorionic gonadotropin (HCG) hormone inducing ovulation of the blacktip grouper (*Epinephelus fasciatus*). 【Method】The mature *E. fasciatus* was used as the target object, and the body length, body weight, and condition factor were measured and calculated. After that,

收稿日期: 2020-03-10

基金项目: 烟台大学博士科研启动基金 (HX2020); 日本学术振兴会 (JSPS) 研究项目 (26660173)

作者简介: 徐文刚 (1985—), 男, 博士, 讲师, 研究方向为海水鱼类繁殖和内分泌, E-mail: xugang3041@163.com

通信作者: 邹华锋 (1976—), 男, 博士, 讲师, 研究方向为鱼类应激生理学, E-mail: hfzou@shou.edu.cn

6 female fishes were injected with HCG (dosage: 200 IU/kg or 500 IU/kg) from July to August in 2018 to conduct maturation induction. 【Result】 Under the 200 IU/kg HCG treatment, before 24 h of the HCG injection, the tertiary yolk stage 1 (Ty1) was detected in oocytes of 5 female fishes. After 48 h of injection, the migratory nucleolus oocytes were found in 2 female fishes, and the tertiary yolk stage 2 (Ty2) was detected in oocytes of 1 female fish. After 60 h of injection, the ovulation phenomenon was observed in 1 female fish, and the Ty2 was found in other 5 female fishes. In the ovulation individual of 200 IU/kg HCG treatment, the oocyte diameter was 477.0 μm during the injection while it increased to 624.4 μm after 60 h of injection. Furthermore, after the steps of injection, ovulation, fertilization and hatching, the total number of eggs obtained was 16906, and the fertilization rate and hatching rate were 68.7% and 43.0%, respectively. However, the ovulation of *E. fasciatus* was not observed in the 500 IU/kg HCG treatment. 【Conclusion】 In conclusion, the 200 IU/kg usage of exogenous HCG hormone treatment may induce the maturation and ovulation in the blacktip grouper. However, to improve the fertilization rate and hatching rate, the injected dosage and effective time should be further regulated.

Key words: *Epinephelus fasciatus*; HCG hormone; ovulation; fertilization; hatching

【研究意义】硬骨鱼类的成熟以及排卵和排精主要受到以下丘脑-垂体-性腺轴为中心的内分泌系统和外界环境因子的综合影响^[1]。鱼类受到光照和水温等环境因子的刺激后,在下丘脑合成促性腺激素释放激素(gonadotropin-releasing hormone, GnRH), GnRH诱导垂体合成促性腺激素(gonadotropins, GtHs), GtHs中的促黄体激素(luteinizing hormone, LH)能诱导生殖细胞合成成熟诱导激素(maturation-inducing hormone, MIH),最终促进排卵和排精^[1]。因此, GnRH和GtHs对诱导鱼类成熟具有重要作用。但是,由于对诱导对象鱼种的GnRH和GtHs的精制较为困难,目前国内外生产上常用人工合成的促黄体激素释放激素类似物(Luteinizing hormone releasing hormone analog, LHRHa)或人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotrophin, HCG)作为替代品^[2-3]。【前人研究进展】国内有报道运用HCG诱导雌性花鳗鲡(*Anguilla marmorata*)性腺成熟^[4]以及注射LHRH对刀鲚(*Coilia nasus*)催产效果的影响^[5],而有关石斑鱼催产和人工繁殖的研究仅在赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*)^[6]、鞍带石斑鱼(*E. lanceolatus*)^[7]和蜂巢石斑鱼(*E. merra*)^[8]中有少量报道。此外,也有少量与石斑鱼的胚胎发育、生长和疾病相关的研究报道^[9-11]。黑边石斑鱼(*E. fasciatus*)广泛分布在中国、日本本州中部以南,以及印度洋和太平洋的热带和温带区域,是一种最大规格为50 cm左右的中小型石斑鱼类^[12]。作为东亚地区重要的水产资源,其具有很高的市场价值,且被认为高级鱼的代表之一。黑边石斑鱼是一种先雌后雄的海水鱼类,一般在

孵化后80~120日龄时性腺分化为雌性,之后在2~3龄时性腺发育成熟并排卵,在3~4龄时性逆转变为雄性^[12]。此前,有关黑边石斑鱼的人工繁殖的技术以及孵化后幼鱼的生长在日本东京小笠原水产研究所有少量研究报道^[13-14],为其鱼苗的大规模培育提供了有价值的线索。

【本研究切入点】目前由于黑边石斑鱼的人工繁殖技术在我国尚未完全获得成功,因此其苗种的获得主要依靠天然捕捞,而过度捕捞和市场上的巨大需求导致其产量快速下降。虽然国内在石斑鱼杂交上的人工繁殖技术已经取得巨大突破,其杂交子二代的养殖产量也逐渐提高^[15-16],但尚未见与黑边石斑鱼人工繁殖相关的报道。【拟解决的关键问题】本研究以在日本长崎市东海海域所捕获的成熟黑边石斑鱼为研究对象,使用不同剂量的HCG在繁殖季节对雌鱼进行催产和成熟诱导,记录其成熟后的状态。此外,比较不同处理剂量下黑边石斑鱼排卵孵化的效应时间以及雌雄交配后受精率和孵化率的差异,优化得出雌鱼的最佳HCG催产剂量和效应时间,以期今后黑边石斑鱼鱼苗在国内大规模的人工繁殖和生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2018年6—7月在日本长崎市东海海域捕获到活的黑边石斑鱼约40尾,自然水温和光照下暂养在5 t左右的FRP水槽中。5 d后用细长的导管插入鱼体卵巢内,采集小部分卵巢组织后,在显微镜下确认其卵母细胞的直径。挑选腹部柔软膨大,卵巢轮廓明显,生殖孔红润,且卵母细胞

直径为 400 μm 以上的雌鱼作为试验鱼, 总数量 18 尾。雄鱼的选取标准为出现婚姻色, 轻压腹部有乳白色精液流出。为了便于今后识别, 在雌鱼背部肌肉内插入微型电子芯片 (FishID SST-1, Destron Fering) 进行标记。

1.2 试验方法

1.2.1 试验分组 试验设注射相同剂量生理盐

水的对照处理和 200 IU/kg HCG 处理、500 IU/kg HCG 处理, 各处理随机分配 6 尾雌鱼。HCG 激素溶液参照 Nambu^[17] 的方法配制。测量雌鱼的体长 (total length, TL) 和体质量 (body weight, BW), 计算肥满度 (condition factor, CF): $CF(\%) = TL/BW^3 \times 100$ 。各处理中鱼的体长、体质量和肥满度均无显著性差异 (表 1)。

表 1 供试黑边石斑鱼的体长、体质量和肥满度

Table 1 Total length, body weight and condition factor of *E. fasciatus* in the experiment

处理 Treatment	雌鱼数量 Number of female fish	体长 Total length (cm)	体质量 Body weight (g)	肥满度 Condition factor (g/cm ³)
对照 Control	6	27.14 \pm 2.85	390.13 \pm 17.21	14.45 \pm 3.21
200 IU/kg HCG	6	29.73 \pm 3.61	433.71 \pm 14.22	16.76 \pm 6.51
500 IU/kg HCG	6	28.01 \pm 4.66	405.85 \pm 22.91	15.68 \pm 1.13

1.2.2 人工催产 7月29日至8月1日, 使用 1 mL 注射器, 将 HCG 注入鱼体侧背部肌肉处后观察试验鱼排卵的变化。注射后, 在效应时间内, 观察到 200 IU/kg HCG 处理中的个体出现排卵现象, 故停止注射试验; 由于没有观察到 500 IU/kg HCG 处理出现排卵现象, 在 8月11—17日, 继续对其进行第二次注射试验。对照处理均在同一时间进行注射。

1.2.3 卵母细胞的采样和组织学观察 在注射前、注射时和注射后的各时段, 使用卵细胞抽取器在试验鱼的泄殖孔提取少量卵细胞用于检测该时段卵母细胞的发育情况。采集后立即置于波恩试剂中固定 24 h 后于 70% 的乙醇中保存用于组织学分析。组织学分析步骤参照 Shein 等^[18] 的方法, 性腺分期和描述如下:

(1) 第三次卵黄球前期 (Tertiary yolkl, Ty1): 细胞质中已积累大量卵黄, 细胞核周围有油球开始聚集, 但核移动还未开始。

(2) 第三次卵黄球后期 (Tertiary yolkl2, Ty2): 细胞质中已积累大量卵黄, 细胞核周围有大量油球聚集, 核移动即将开始。

(3) 核移动期 (Migratory nucleolus, Mn): 细胞核移动到动物极一侧。

(4) 成熟期 (Mature, M): 细胞核破裂, 卵黄球和油球融合且分散在细胞质中。

(5) 完熟期 (Ripe, R): 卵母细胞通过吸水达到透明化的状态。

(6) 滤泡闭锁卵母细胞 (Atretic follicle

oocyte, Af): 又称退行卵母细胞, 滤泡细胞与未发育的卵母细胞结合形成闭锁卵泡, 并对卵母细胞的残体和碎片进行吞噬和消化。

1.2.4 鱼成熟度的确认 排卵前, 在鱼的卵巢内插入一根细长的导管, 采集部分卵巢组织, 在显微镜下测量其中 15 ~ 30 粒卵母细胞的直径, 直径大于 500 μm 即可视为其已经完熟并具备排卵的条件。200 IU/kg HCG 处理插入导管的时间为注射前 24 h, HCG 注射时以及注射后 30、36、42、48、54、60 h。500 IU/kg HCG 处理插入导管的时间除了与前述处理一致外, 须在第二次注射后 30、36、42、48、54、60、66 h 后再次对成熟度进行确认。

1.2.5 人工授精以及受精率和孵化率的计算 对具备排卵条件的个体, 挤压腹部采集卵子; 对成熟的雄性, 挤压腹部采集精子, 并采用娄忠玉等^[19] 的干导法进行人工授精。人工授精后, 用海水清洗受精卵, 放置在 1 L 量筒中。静置后分为上浮卵和下沉卵, 将上浮卵回收在 500 mL 的容器中, 并将容器放置在维持自然水温的水槽中。人工授精后 2.5 h 取 100 粒受精卵转移到培养皿中, 在显微镜下观察细胞分裂的情况, 计算受精率。此外, 根据受精后 24 h 孵化的鱼苗数量以及死亡卵数, 计算孵化率。

1.3 数据处理

利用 SPSS 22.0 软件对数据进行比较分析。采用 Kolmogorov-Smirnov 或 Shapiro-Wilk 法进行

正态分布检测, 利用 ANOVA 检验以及 Tukey's HSD 法进行差异性比较分析。

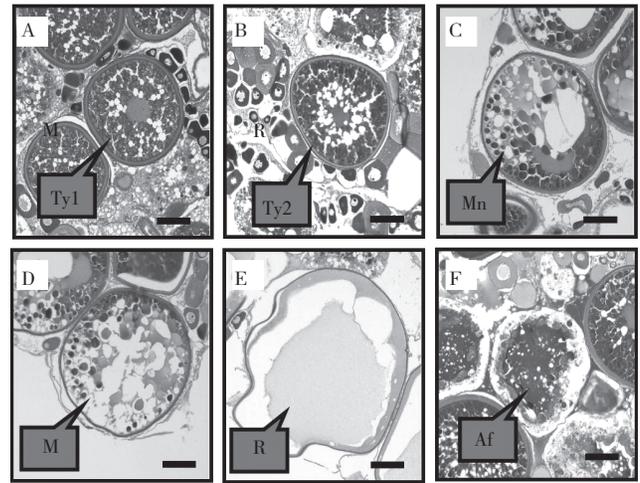
2 结果与分析

2.1 不同处理注射 HCG 前后卵母细胞发育阶段的变化

2.1.1 对照处理与 200 IU/kg HCG 处理的比较 对黑边石斑鱼性腺进行组织学切片和染色, 其各发育阶段分期如图 1 所示。根据图 1 判定对照处理和 200 IU/kg HCG 处理注射前 24 h、注射时和注射后 30、36、42、48、54、60 h 卵母细胞的发育阶段, 如表 2 所示。对照处理中, 注射前 6 尾鱼卵母细胞均处于 Ty1 阶段, 注射后 60 h 4 尾鱼卵母细胞处于 Ty1 阶段, 2 尾鱼处于 Ty2 阶段。200 IU/kg HCG 处理中, 注射 HCG 24 h 前, 6 尾鱼中有 5 尾鱼为 Ty1 阶段; 注射 HCG 时, 5 尾鱼为 Ty2 阶段; 注射 HCG 30、36、42 和 54 h 后 1 尾鱼观察到核移动卵母细胞 (Mn), 2 尾鱼为 Ty2 阶段; 但注射 48 h 后 2 尾鱼出现 Mn 阶段, 1 尾鱼为 Ty2 阶段; 注射 60 h 后 1 尾鱼出现排卵现象, 其余 5 尾鱼均为 Ty2 阶段。

2.2.2 对照处理与 500 IU/kg HCG 处理的比较 根据图 1 判定, 对照处理和 500 IU/kg HCG 处理注射前 24 h、第一次注射 0、30、36、42、48、54 h 后以及第二次注射 0、30、36、42、48、54、60、66 h 卵母细胞的发育情况, 如表 3 所示。

对照处理在第二次注射后 66 h, 3 尾鱼卵母细胞处于 Ty1 阶段, 3 尾鱼处于 Ty2 阶段。500 IU/kg HCG 处理中注射 HCG 24 h 前, 6 尾鱼中只有 2 尾鱼卵母细胞为 Ty1 阶段。此外, 虽然注射 HCG 48—54 h 后, 所有检测到的尾鱼均为 Ty2 阶段, 但并未观察到成熟的卵母细胞, 因此继续进行第二次注射试验。第二次注射后 42—60 h, 检测到 1 尾鱼出现 Mn 阶段; 注射后 66 h, 所有个体均无法排卵且观察到了退行的卵母细胞 (Af)。



A: 第三次卵黄球前期; B: 第三次卵黄球后期; C: 核移动期; D: 成熟期; E: 完全期; F: 滤泡闭锁卵母细胞。标尺: 100 μm
A: Tertiary yolk 1, Ty1; B: Tertiary yolk 2, Ty2; C: Migratory nucleolus, Mn; D: Mature, M; E: Ripe, R; F: Atretic follicle oocyte, Af. Scale: 100 μm

图 1 不同发育阶段雌性黑边石斑鱼性腺的切片
Fig.1 Histological sections of female *E. fasciatus* at different gonadal development stages

表 2 对照处理和 200 IU/kg HCG 处理前后黑边石斑鱼卵母细胞发育阶段的变化

Table 2 Changes of *E. Fasciatus* in the oocyte development stage under control and 200 IU/kg HCG treatments

处理 Treatment	个体 Individual	注射前 1 d 1 d before injection	注射时 During injection	注射后 After injection					
				30 h	36 h	42 h	48 h	54 h	60 h
对照 Control		Ty1 (6)	Ty1 (6)	Ty1 (6)	Ty1 (6)	Ty1 (6)	Ty1 (6)	Ty1 (6)	Ty1 (4) Ty2 (2)
200 IU/kg HCG	1	Ty1	Ty2	Mn	Ty2	Ty2	Ty2	Ty2	Ty2
	2	-	Ty2	-	-	-	-	-	Ty2
	3	Ty1	Ty2	Ty2	Mn	Mn	Mn	Ty2	Ty2
	4	Ty1	Ty2	Ty2	Ty2	Ty2	Mn	Mn	R
	5	Ty1	Ty2	-	-	-	-	-	Ty2
	6	Ty1	-	-	-	-	-	-	Ty2

注: Ty1: 第三次卵黄球前期; Ty2: 第三次卵黄球后期; Mn: 核移动期; R: 完全期。“-”代表未检测到。
Note: Ty1: Tertiary yolk 1; Ty2: Tertiary yolk 2; Mn: Migratory nucleolus; R: Ripe. “-” represents undetected.

2.2 不同处理注射 HCG 后卵母细胞直径的变化比较 200 IU/kg HCG 处理和 500 IU/kg HCG

处理中 6 尾鱼 HCG 注射时和注射 60 h 后卵母细胞直径的变化。HCG 注射时, 200 IU/kg HCG 处

表 3 对照处理和 500 IU/kg HCG 处理前后黑边石斑鱼卵母细胞发育阶段的变化

Table 3 Changes of *E. Fasciatus* in the oocyte development stage under control and 500 IU/kg HCG treatments

处理 Treatment	个体 Individuals	注射前 1 d 1 d Before injection	第一次注射 The first injection						第二次注射 The second injection							
			0 h	30 h	36 h	42 h	48 h	54 h	0 h	30 h	36 h	42 h	48 h	54 h	60 h	66 h
对照 Control		Ty1 (6)	Ty1 (6)	Ty1 (6)	Ty1 (6)	Ty1 (6)	Ty1 (6)	Ty1 (4)	Ty1 (4)	Ty1 (4)	Ty1 (4)	Ty1 (4)	Ty1 (4)	Ty1 (4)	Ty1 (4)	Ty1 (3)
								Ty2 (2)	Ty2 (2)	Ty2 (2)	Ty2 (2)	Ty2 (2)	Ty2 (2)	Ty2 (2)	Ty2 (2)	Ty2 (3)
500 IU/kg HCG	1	-	Ty1	Ty2	Ty2	Ty2	Ty2	Ty2	Ty2	-	-	-	-	-	-	Ty1
	2	-	-	Ty1	-	Ty1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Af
	3	-	Ty2	Ty2	Ty2	Ty2	Ty2	-	-	-	-	-	-	-	-	Ty2
	4	Ty1	Ty1	Ty1	Ty2	Ty2	-	Ty2	-	-	Ty2	-	-	-	-	Af
	5	-	Ty2	Ty2	-	-	Ty2	-	-	-	-	-	-	-	-	Af
	6	Ty1	Ty2	Ty2	Ty2	Ty2	Ty2	Ty2	Ty2	Ty2	Mn	Mn	Mn	Mn	Mn	Ty2

注: Ty1: 第三次卵黄球前期; Ty2: 第三次卵黄球后期; Mn: 核移动期; Af: 闭锁卵泡。“-”代表未检测到。

Note: Ty1: Tertiary yolk 1; Ty2: Tertiary yolk 2; Mn: Migratory nucleolus; Af: Atretic follicle. “-” represents undetected.

理的 4 号个体卵母细胞直径仅为 477.0 μm, 注射 60 h 后其为排卵阶段, 卵母细胞直径增加至 624.4 μm; 500 IU/kg HCG 处理的个体卵母细胞直径无较大差异 (表 4)。

2.3 不同处理注射 HCG 后受精率和孵化率的差异

200 IU/kg HCG 处理获得的总卵数为 16 906 粒, 受精率为 68.7%, 孵化率为 43%; 500 IU/kg HCG 处理因未观察到排卵现象而无法统计受精率和孵化率。

3 讨论

3.1 诱导时间对排卵的影响

本研究中, 对照处理的黑边石斑鱼始终无法成熟, 一直停留在第三次卵黄球发育 (Ty) 阶段, 但 200 IU/kg HCG 处理的卵母细胞在注射前处于 Ty 阶段, 注射 48 h 后卵巢已发育至核移动期并成熟, 60 h 后确认排卵。此外, 该处理人工受精率为 68.7%, 孵化率为 43%, 表明剂量为 200 IU/kg 的外源 HCG 激素可以诱导黑边石斑鱼成熟并排卵。褐石斑鱼 (*E. bruneus*) 中, 注射 HCG 48 h 后能够诱导排卵, 受精率约

为 90%, 孵化率为 60% ~ 80% [20]。七带石斑鱼 (*E. septemfasciatus*) 中, 注射 HCG 42 h 后确认排卵, 受精率为 70% ~ 98%, 孵化率为 70% ~ 100% [21]。与上述 HCG 诱导的时间相比, 本研究的诱导时间 60 h 显得稍长, 表明即使同为石斑鱼鱼种, 其注射 HCG 激素后生殖生理变化和反应速度也会有很大不同, 从而导致排卵诱导时间的差异。此外, 与其他石斑鱼相比, 本研究供试黑边石斑鱼的受精率和孵化率均较低, 并且在成熟阶段出现了很多退行卵母细胞。因此在今后的研究中, 需要再次调整从成熟到排卵的效应时间。

3.2 退行卵形成的主要原因

本试验中, 虽然使用 HCG 诱导促进了部分个体卵母细胞的成熟, 但在很多个体的卵巢内出现了退行卵, 其形成的可能原因有以下方面: 首先, 在检测鱼的卵母细胞发育程度时, 多次使用导管对鱼的卵巢进行取样。对七带石斑鱼的研究表明, 这些行为可能对鱼产生物理性的影响, 导致其压力负荷大, 发育成熟迟缓和退行 [22], 这也可能是导致黑边石斑鱼退行卵形成的原因之一。此外, 本研究中的试验鱼是在东海捕获的天然鱼,

表 4 200 IU/kg 和 500 IU/kg HCG 处理注射时和注射 60 h 后黑边石斑鱼卵母细胞直径的变化

Table 4 Changes of oocyte diameter of *E. Fasciatus* during and after 60 h of HCG injection under 200 IU/kg and 500 IU/kg treatments

处理 Treatment	卵母细胞直径 Oocyte diameter (μm)	个体 Individual					
		1	2	3	4	5	6
200 IU/kg HCG	HCG 注射时	538.5	599.1	546.2	477.0	546.9	516.2
	HCG 注射后 60 h	499.7	516.3	516.7	624.4	489.5	521.8
500 IU/kg HCG	HCG 注射时	435.1	441.2	487.5	446.4	490.2	455.2
	HCG 注射后 60 h	489.1	477.8	471.3	483.1	513.4	423.1

而不是人工长期饲养的亲鱼,因此其生理和营养状态也存在差异。研究表明,凤尾鱼(*Engraulis mordax*)处于饥饿下会引起卵巢的再吸收而导致其退化^[23]。本试验中,采取无投食饲养的方法,可能是导致黑边石斑鱼退行卵形成的另一原因。研究表明,黑边石斑鱼从卵黄蓄积到成熟产卵的时间在6—7月,青铜石斑鱼(*E. aeneus*)在4—7月^[24],赤点石斑鱼在4—6月^[25],七带石斑鱼在3—5月^[18],褐石斑鱼在3—5月^[26]。这些数据表明,其他石斑鱼从卵黄蓄积到产卵的时间大概持续2个月左右,但黑边石斑鱼仅持续1个月,可能由于其成熟适应期的时间太短而导致其成熟比例降低。此外,6—7月为高水温时期,高水温抑制成熟,因此卵黄蓄积后到成熟产卵的状态难以得到长期维持,也可能导致其无法正常排卵。

4 结论

本研究200 IU/kg HCG处理的6尾黑边石斑鱼在注射HCG 60 h后,最终虽然只有1尾鱼成熟且排卵、受精和孵化,其结果可能具有偶然性。但本研究提供了以下可能性:在今后黑边石斑鱼人工繁殖和孵化的过程中,使用剂量为200 IU/kg外源HCG激素可能诱导其成熟且排卵;但为了提高排卵率、受精率和孵化率,其注射剂量和效应时间还需要进一步调节。此外,为了避免退行卵的形成,应该注意防止水温过高以及频繁使用导管对鱼的卵巢进行破坏性取样。目前,黑边石斑鱼人工繁殖技术的突破在国内仍是一大难题,因此,在今后人工繁殖过程中应综合考虑以上因素。

参考文献 (References):

- [1] 魏华, 吴垠. 鱼类生理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2014: 253–288, 290–323.
WEI H, WU Y. Fish physiology [M]. BeiJing: China Agricultural Press, 2014: 253–288, 290–323.
- [2] CHI M L, NI M, LI J F, HE F, QIAN K, ZHANG P, CHAI S H, WEN H S. Molecular cloning and characterization of gonadotropin subunits (GTH α , FSH β and LH β) and their regulation by hCG and GnRH α in Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*) in vivo [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2015, 41 (3): 587–601. doi: 10.1007/s10695-014-9992-x.
- [3] ALCÁNTAR VÁZQUEZ J P, PLIEGO CORTÉS H S, DUMAS S, PEÑA R, ROSALES-VELÁZQUEZ M, PINTOS P A. Effects of a luteinizing hormone-releasing hormone analogue (LHRHa) on the reproductive performance of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* (Percoidae: Serranidae) [J]. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 2016, 44 (3): 487–496. doi: 10.3856/vol44-issue3-fulltext-7.
- [4] 王磊, 李响, 柳峰松, 刘利平. 不同激素对雌性花鲢性体指数和发育过程中促性腺激素基因(*GtHa*, *FSH β* , *LH β*)表达的影响[J]. 水产学报, 2015, 39 (5): 609–617. doi: 10.11964/jfc.20141109559.
WANG L, LI X, LIU F S, LIU L P. Impact of injection of different hormones on gonadosomatic index and expression of gonadotropin genes (*GtHa*, *FSH β* , *LH β*) in female marbled eel (*Anguilla marmorata*) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39 (5): 609–617. doi: 10.11964/jfc.20141109559.
- [5] 徐钢春, 杜富宽, 黎燕, 张勇, 徐跑. 注射LHRH-A2对刀鲚的催产效果及其雌鱼血液生化指标的影响[J]. 水产学报, 2016, 40 (8): 1186–1194. doi: 10.11964/jfc.20151110146.
XU G C, DU F K, LI Y, ZHANG Y, XU P. Effects of LHRH-A2 on induced spawning and responses of plasma biochemical indices of *Coilia nasus* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40 (8): 1186–1194. doi: 10.11964/jfc.20151110146.
- [6] 舒璇, 刘晓春, 林浩然. LHRH-A缓释剂对雌性赤点石斑鱼卵巢发育、性类固醇激素分泌及脑垂体GTH细胞超微结构的影响[J]. 动物学研究, 2005, 26 (4): 422–428. doi: 10.3321/j.issn:0254-5853.2005.04.014.
SHU H, LIU X C, LIN H R. Effects of sustained administration of LHRH-A on ovary development, sex steroid hormone secretion and ultrastructure of gonadotropic cell in *Epinephelus akaara* [J]. *Zoological Research*, 2005, 26 (4): 422–428. doi: 10.3321/j.issn:0254-5853.2005.04.014.
- [7] 张海发, 王云新, 刘付永忠, 黄国光, 欧冲辉, 黄培卫, 梁伟峰. 鞍带石斑鱼人工繁殖及胚胎发育研究[J]. 广东海洋大学学报, 2008, 28 (4): 36–40.
ZHANG H F, WANG Y X, LIUFU Y Z, HUANG G G, OU C H, HUANG P W, LIANG W F. Studies on artificial propagation and embryonic development of *Epinephelus lanceolatus* [J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2008, 28 (4): 36–40.
- [8] 左永松, 仲地政人, 中村将, 征矢野清, 陈再忠, 钟俊生. 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[J]. 上海海洋大学学报, 2013, 22 (6): 841–848.
ZUO Y S, NAKACHI M, NAKAMURA M, SOYANO K, CHEN Z Z, ZHONG J S. 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 [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2013, 22 (6): 841–848.
- [9] 胡娟, 林芳妹, 吕晴霁, 王庆, 杨慧荣, 石和荣, 赵会宏. *Dmrt*基因在斜带石斑鱼胚胎发育不同阶段的表达分析[J]. 广东农业科学, 2019, 46 (3): 125–132. doi: 10.16768/j.issn.1004-874X.2019.03.018.
HU J, LIN F M, LYU Q J, WANG Q, YANG H R, SHI H R, ZHAO H H. Analysis on the expression of *Dmrt* gene in different stages of embryonic development of *Epinephelus coioides* [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2019, 46 (3): 125–132. doi: 10.16768/

- j.issn.1004-874X.2019.03.018.
- [10] 王永波, 王秀英, 刘金叶, 刘天密. 海南岛石斑鱼刺激隐核虫病发病规律调查[J]. 广东农业科学, 2016, 43(5): 152-156. doi: 10.16768/j.issn.1004-874X.2016.05.029.
- WANG Y B, WANG X Y, LIU J Y, LIU T M. Investigation of development laws of grouper *Cryptocaryon irritans* on Hainan island [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2016, 43(5): 152-156. doi: 10.16768/j.issn.1004-874X.2016.05.029.
- [11] 黄忠, 赵书燕, 林黑着, 杨小立, 廖经球, 周传朋, 戚常乐. 饲料蛋白中添加虾蛋白肽对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼生长性能和抗氧化指标的影响[J]. 广东农业科学, 2017, 44(3): 128-135. doi: 10.16768/j.issn.1004-874X.2017.03.01.
- HUANG Z, ZHAO S Y, LIN H Z, YANG X L, LIAO J Q, ZHOU C P, QI C L. Effects of dietary shrimp protein-peptides on growth performance and antioxidant indices of juvenile *Epinephelus lanceolatus* × *E. fuscoguttatus* under two dietary protein levels [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2017, 44(3): 128-135. doi: 10.16768/j.issn.1004-874X.2017.03.01.
- [12] KAWABE K, KATO K, KIMURA J, SAITO M, ANDO K, KAKIUCHI K. Growth of reared blacktip grouper *Epinephelus fasciatus* in Chichijima, Ogasawara Islands, southern Japan [J]. *Aquaculture Science*, 1997, 45(2): 207-212.
- [13] KAWABE K, KOHNO H. Effects of feeding frequency and stocking density on the survival, growth and feed conversion efficiency of reared young blacktip grouper *Epinephelus fasciatus*, during intermediate culture [J]. *Aquaculture Science*, 2014, 62(3): 289-294. doi: 10.11233/aquaculturesci.62.289.
- [14] KAWABE K, KATO K, KIMURA J. Year round spawning of reared blacktip grouper, *Epinephelus fasciatus*, in Chichi-jima, Ogasawara Islands, Southern Japan [J]. *Aquaculture Science*, 2000, 48(3): 467-473. doi: org/10.11233/aquaculturesci1953.48.467.
- [15] 吴水清, 李加儿, 区又君, 吕国敏, 刘江华. 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. doi: 10.3724/SP.J.1118.2014.00503.
- WU S Q, LI J E, QU Y J, LV G M, LIU J H. Allometric growth of hybrid grouper (*Epinephelus coioides* ♀ × *E. lanceolatus* ♂) larvae and juveniles [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(3): 503-510. doi: 10.3724/SP.J.1118.2014.00503.
- [16] RIMMER M A, GLAMUZINA B. A review of grouper (Family Serranidae: Subfamily *Epinephelinae*) aquaculture from a sustainability science perspective [J]. *Reviews in Aquaculture*, 2019, 11(1): 58-87. doi: 10.1111/raq.12226.
- [17] NAMBU T. Seed production and aquaculture technology of red spotted grouper *Epinephelus akaara* [J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 2014, 80(6): 1000. doi: 10.2331/suisan.80.1000.
- [18] SHEIN N L, CHUDA H, ARAKAWA T, MIZUNO K, SOYANO K. Ovarian development and final oocyte maturation in cultured sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus* [J]. *Fishery Science*, 2004, 70(3): 360-365. doi:10.1111/j.1444-2906.2004.00814.x.
- [19] 娄忠玉, 张艳萍, 焦文龙, 秦懿, 王大, 周蓉. 黄河上游极边扁咽齿鱼人工繁殖试验[J]. 水产科学, 2010, 29(10): 610-612. doi: 10.16378/j.cnki.1003-111.2010.10.011.
- LOU Z Y, ZHANG Y P, JIAO W L, QIN Y, WANG T, ZHOU R. Artificial reproduction technology of *Platypharodon extremus* in upper reaches of Yellow River [J]. *Fisheries Science*, 2010, 29(10): 610-612. doi:10.16378/j.cnki.1003-111.2010.10.011.
- [20] IMAIZUMI H, HOTTA T, OHTA H. Cryopreservation of Kelp grouper *Epinephelus bruneus* sperm and comparison of fertility of fresh and cryopreserved sperm [J]. *Aquaculture Science*, 2005, 53(4): 405-411.
- [21] TSUCHIHASHI Y, TAKATORI Y, KURIYAMA I, HANYUU K, TSUJI M, TSUMOTO K. Induced spawning of cultured Sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*, in September by manipulation of water temperature and photoperiod [J]. *Aquaculture Science*, 2007, 55(3): 395-402.
- [22] SOYANO K, SAKAKURA Y, HAGIWARA A. Reproduction and larviculture of seven-band grouper, *Epinephelus septemfasciatus*, in Japan//LIAO I C, LEANO E M. The Aquaculture of Groupers [M]. Asian Fisheries Society, World Aquaculture Society, The Fisheries Society of Taiwan, Taiwan, 2008: 1-11.
- [23] HUNTER J R, MACEWICZ B J. Rates of atresia in the ovary of captive and wild northern anchovy, *Engraulis mordax* [J]. *Fishery Bulletin*, 1985, 83(2): 119-136. doi:10.1016/0165-7836(85)90027-X.
- [24] HASSIN S, MONBRISON D D, HANIN Y, ELIZUR A, ZOHAR Y, POPPER D M. Domestication of the white grouper, *Epinephelus aeneus* 1. Growth and reproduction [J]. *Aquaculture*, 1997, 156(3-4): 305-316. doi: 10.1016/s0044-8486(97)00136-1.
- [25] TANAKA H. Sexual maturation and sex reversal in red spotted grouper, *Epinephelus akaara* [J]. *Bulletin of National Research Institute of Aquaculture*, 1990, 17: 1-15.
- [26] CHUDA H. Seed production and aquaculture technology of longtooth grouper *Epinephelus bruneus* [J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 2014, 80(6): 999. doi: 10.2331/suisan.80.999.

(责任编辑 崔建勋)