

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20181017002

http://www.yykxjz.cn/

田永胜, 唐江, 马文辉, 成美玲, 李振通, 吴玉萍, 张晶晶, 王林娜, 庞尊方, 王晓梅, 翟介明. 蓝身大斑石斑鱼冷冻精子(♂)与棕点石斑鱼(♀)杂交后代发育及生长特征分析. 渔业科学进展, 2019, 40(6): 36-47
Tian YS, Tang J, Ma WH, Cheng ML, Li ZT, Wu YP, Zhang JJ, Wang LN, Pang ZF, Wang XM, Zhai JM. Development and growth of hybrid offspring of brown grouper *Epinephelus fuscoguttatus* (♀) × blue speckled grouper *Epinephelus tukula* (♂) using cryopreserved sperm. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(6): 36-47

蓝身大斑石斑鱼冷冻精子(♂)与棕点石斑鱼(♀) 杂交后代发育及生长特征分析*

田永胜^{1,2①} 唐江^{1,3} 马文辉⁵ 成美玲^{1,4} 李振通^{1,3}
吴玉萍^{1,4} 张晶晶^{1,3} 王林娜^{1,2} 庞尊方⁵ 王晓梅⁵ 翟介明⁵

1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛 266071;
2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071;
3. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 4. 大连海洋大学水产与生命学院 大连 116023;
5. 莱州明波水产有限公司 莱州 261400)

摘要 蓝身大斑石斑鱼(*Epinephelus tukula*)和棕点石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus*)在自然环境中存在地理分布、繁殖时间和温度等方面的生殖隔离。本研究利用蓝身大斑石斑鱼冷冻精子与棕点石斑鱼卵人工授精,在水温为30℃、盐度为20的条件下培育,对其胚胎发育、胚后变态发育进行了详细的观察,利用显微镜和解剖镜拍摄、记录胚胎发育和变态发育的形态特征和发育时序,统计了杂交受精率、孵化率和畸形率,并对鱼苗生长进行了测量。结果显示,杂交受精卵经过1037 min完成胚胎发育。原肠早期,在胚层一侧就形成了胚盾,神经管在胚孔封闭时也开始出现,在视泡和耳囊发育的同时,克氏囊(末球)也开始形成。在心脏跳动之前,胚体先开始抽动,当977 min肌节发育到23对时,心脏开始间歇性的跳动,间歇时间24~40 s,心率98次/min;发育到1018 min时,间歇时间变短,心率约为93次/min;之后间歇性现象消失,心跳频率达到93次/min,这些现象在以往鱼类胚胎发育资料中均无记载。变态发育的典型特征是三叉棘的生长和退化,杂交幼鱼3 mm(10 d)时,形成背鳍棘和腹鳍棘;全长21.5 mm(35 d)时,三叉棘退化,完成变态发育;55.3 mm(45 d)时,表型特征与成体相似。冷冻精子的受精率、孵化率和畸形率分别为(76.67±5.77)%、(85.67±5.13)%和(6.33±1.54)%,与新鲜精子无显著差异($P<0.05$)。鱼苗65 d时,体长达到8.89 cm,杂交后代体色趋于一致,且生长速度快;1龄时,平均全长和体重分别达(32.58±1.60) cm和(559.76±80.85) g。对比养殖实验显示,1龄棕点石斑鱼(♀)×蓝身大斑石斑鱼(♂)杂交后代体重是棕点石斑鱼(♀)×鞍带石斑鱼(♂)杂交后代的1.63倍,全长为1.24倍;这一时期的生长方程为 $W=0.0311L^{2.8079}$, $R^2=0.9886$ 。研究结果表明,蓝身大斑石斑鱼和棕点石斑鱼杂交胚胎和胚后发育不存在遗传障碍,后代受精率和孵

* 烟台市重点研发计划(2016JH021)、烟台市高端人才引进“双百计划”项目和黄海水产研究所基本科研业务费(20603022019002; 20603022018019)共同资助 [The work was supported by Yantai Science and Technology Development Plan (2016JH021), the Double-Hundred Talent Project of Yantai City, Shandong Province, and Special Fund for Basic Scientific Research Business of Central Public Research Institutes, YSFRI, CAFS (20603022019002; 20603022018019)].

① 通讯作者: 田永胜, 研究员, E-mail: tianys@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2018-10-17, 收修改稿日期: 2018-11-13

化率高、畸形率低, 具有生长快杂交优势, 为2种石斑鱼杂交育种和苗种大量培育提供了一定的遗传基础。

关键词 蓝身大斑石斑鱼; 棕点石斑鱼; 杂交; 胚胎发育; 变态发育; 成活率

中图分类号 Q321+.3 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)06-0036-12

蓝身大斑石斑鱼(*Epinephelus tukula*), 俗称金钱斑, 是石斑鱼的大型品种之一, 在我国南部海域、台湾北部及澎湖海域有分布。身体为白色到灰色, 全身覆盖着大块的黑斑, 分布于5~150 m的深度海水中。蓝身大斑石斑鱼生长快、肉质鲜美, 能生长到2 m, 体重达100 kg。近年来, 人们对其人工繁殖和养殖技术(沈士新, 2011)、性别转化(Yeh *et al*, 2003)、神经坏死病防治(Kai *et al*, 2010)及线粒体基因(Yang *et al*, 2016)等进行了研究, 但相关的研究报道不多。由于人工繁殖和苗种培育技术还未成熟, 市场上的养殖量很少, 但通过杂交育种将其生长优势性状充分利用, 有利于改良杂交后代的生长性状。

棕点石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus*)又称老虎斑, 广泛分布于印度洋和太平洋的热带、亚热带海域, 是主要的石斑鱼养殖品种之一, 生长速度较慢, 当年养殖苗种体重可达493 g(符书源等, 2013)。因此, 近年来利用棕点石斑鱼为母本与鞍带石斑鱼(*Epinephelus lanceolatus*)雄鱼进行杂交, 培育出了“虎龙杂交斑”, 生长速度较母本提高110%(张海发等, 2014), 并对杂交后代胚胎发育(陈超等, 2014)、摄食与生长(于欢欢等, 2015)、染色体核型(刘莉等, 2016)、亲本和杂交后代甲基化变异特点(周莹等, 2017)等进行了研究。“虎龙杂交斑”又称珍珠龙胆, 是目前市场上大量养殖的石斑鱼杂交品种, 每年的苗种量大约在1亿尾左右, 极大推动了石斑鱼养殖产业的发展, 但在养殖中发现多批鱼苗畸形率高和死亡率高的问题。为了提高棕点石斑鱼及杂交后代生长速度、抗病性能和养殖品质, 在其品种改良方面还需进一步探索。

蓝身大斑石斑鱼和棕点石斑鱼在自然环境中存在着一定的地理分布、繁殖时间和温度等方面的生殖隔离, 未发现自然杂交的现象。本研究利用冷冻精子可以突破以上生殖隔离的特点, 在国内外首次研究和冷冻保存了蓝身大斑石斑鱼的精子, 并建立了精子冷冻库, 并首次利用其冷冻精子与棕点石斑鱼进行杂交育种实验, 对其杂交后代胚胎和胚后变态发育、受精率、畸形率、正常发育率进行详细的观察和统计分析, 以期对蓝身大斑石斑鱼和棕点石斑鱼杂交育种及石斑鱼种质改良提供生物学依据。

1 材料与方法

1.1 蓝身大斑石斑鱼精子冷冻保存

利用莱州明波水产有限公司培育的蓝身大斑石斑鱼亲鱼群体30尾, 体重为20~30 kg/尾, 体长为50~70 cm, 在4~6月性成熟季节, 挑选发育较好的雄鱼, 利用5~10 mg/L MS-222麻醉(上海康汀生物科技有限公司), 在胸鳍基部一次注射绒毛膜促性腺激素(HCG) 200~300 IU/kg、促排卵激素类似物(LHRH-A) 35 µg/kg进行人工催产(HCG和LHRH-A购自宁波第二激素厂), 注射48 h后, 利用挤压腹部法采集成熟雄鱼精液, 利用精子冷冻保存液ELs-3冷冻保存精子(Tian *et al*, 2015), 将精子贮存在生物液氮罐中, 授精时在37℃水浴中解冻。

1.2 棕点石斑鱼卵子的采集和杂交授精

利用以上公司培育的棕点石斑鱼亲鱼50尾, 体重为3~7 kg/尾, 体长为30~40 cm, 在性成熟季节利用人工挤压腹部法采集1尾成熟鱼卵子2000 g, 将卵盛在塑料盆中, 将解冻的蓝身大斑石斑鱼精子5 ml加入卵中, 充分搅拌混合, 加入2倍体积海水(30℃)激活受精, 精卵受精比例为1:400。同时采集成熟蓝身大斑石斑鱼雄鱼新鲜精子与棕点石受精卵受精, 作为对照组。加入海水后静置5~10 min, 分离过滤下沉的死卵, 将上浮卵利用海水反复冲洗和过滤, 洗去卵液, 之后将受精卵放入3 m³孵化罐中孵化, 水温保持30℃, 盐度30, 同时给孵化水中充氧5~10 mg/L。

1.3 胚胎发育及受精率、孵化率统计

在受精卵孵化过程中连续采集受精卵样本, 利用DSY2000X倒置生物显微镜(重庆光电仪器有限公司)观察胚胎发育过程, 记录胚胎发育特征和发育时间, 同时在镜下拍摄胚胎发育特征照片。胚胎发育到囊胚期, 分别采集冷冻精子受精卵和新鲜精子受精卵100~200粒统计受精率, 孵化出膜后统计孵化率及正常发育率, 分别进行3次统计。

1.4 胚后变态发育观察

受精卵发育到尾芽期时, 利用筛绢网从孵化缸中

将受精卵过滤,在静水中自然沉淀分离下沉的死卵,将受精卵运输到育苗车间,放入 30 m³ 水泥池中孵化和培育,每池放入受精卵 300 g,鱼苗培育水温为 26℃~27℃,培育方法参照棕点石斑鱼和云纹石斑鱼人工繁育及工厂化养殖技术(王建钢等,2008;宋振鑫等,2012)。变态发育早期,每 5 d 采集鱼苗观察 1 次,发育后期,每 10 d 采集鱼苗观察 1 次,同时测量体长并拍摄发育特征图片。

1.5 棕点石斑鱼(♀)×蓝身大斑石斑鱼(♂)杂交后代与珍珠龙胆生长对比

在莱州明波水产有限公司,利用工厂化循环水进行棕点石斑鱼(♀)×蓝身大斑石斑鱼(♂)杂交后代(简称金虎斑)与珍珠龙胆生长对比养殖实验,分别在 2 个 30 m³ 流水池中放养金虎斑和珍珠龙胆鱼苗 2000 尾,体长为 6~7 cm。养殖池循环水量为 12~18 个循环,水温 22℃~28℃、pH 7.8~8.2、盐度 28~32、养殖池出水口溶氧量(DO)≥10 mg/L、氨氮(NH₄-N)≤0.1 mg/L,投喂颗粒饲料,每天投喂 2 次,投喂量为鱼体重的 2%~3%。在杂交鱼苗生长到 180~370 d,在养殖群体中随意抽取 40~50 尾,对其生长体重、全长、体长和体高进行测量,利用 Excel 软件计算平均值,并利用幂函数模型 $W=aL^b$ 拟合体重和全长生长方程,分析其生长速率。

1.6 发育图片及数据处理

胚胎发育和胚胎后发育图片利用 Photoshop 软件进行编辑处理。受精率、孵化率和正常发育率数据利用 SPSS 程序单因素方差分析法(One-way ANOVA)处理,采用 Student-Newman-Keuls 进行多重比较和差异显著性分析, $P<0.05$ 表示具有显著性差异。计算数据利用 Excel 程序作图。

2 结果

2.1 杂交胚胎发育

棕点石斑鱼(♀)和蓝身大斑石斑鱼(♂)杂交胚胎经过细胞分裂期、囊胚期、原肠期、胚体形成、视泡和耳囊形成、神经脊和肌节形成、尾芽期、心跳期和胚转动期发育,完成胚胎发育,在 30℃ 水温下历时 1037 min,孵化出膜,每一阶段的发育时间和发育特征的详细描述见表 1 和图 1。

2.2 杂交鱼苗变态发育

杂交鱼苗在孵化后第 2 天卵黄囊明显缩小,鳍褶从头部到卵黄囊后连为一体,发育完整,肠为直管状,

排泄孔从腹部伸出,体长为 2 mm。孵化后 5 d 鱼苗胸鳍、腹鳍完成分化,晶体黑色素加深,身体出现色素黑斑,体长约为 2.5 mm。孵化后 10 d 鱼苗三叉棘形成,背鳍、尾鳍和臀鳍膜仍然相连,肌节清晰,在腹部后侧形成 1 个黑色素斑,肠道中充满食物,体长达 3 mm。孵化后 15 d 鱼苗冠状棘、腹鳍棘继续伸长,可达尾鳍基部,背鳍、尾鳍和臀鳍完全分化,鳍条清晰,体长达 4.3 mm。孵化后 20 d 鱼苗,三叉棘变粗,棘上小刺清晰,腹鳍棘开始收缩变短,上颌齿明显,体长达 8.7 mm。孵化后 25 d 鱼苗,腹鳍刺明显变短,体长为 11.5 mm。孵化后 30 d 鱼苗,背鳍棘和腹鳍棘明显收缩,背鳍棘至尾柄前端,腹鳍棘到臀鳍起点,尾部色素斑消失,体长为 15.3 mm。孵化后 35 d 鱼苗,背鳍棘和腹鳍棘退化,尾鳍发达,在各鳍条上出现节状黑色素斑,体长为 21.5 mm。孵化 45 d 鱼苗,变态完成,体表出现方格状黑色素斑,背区黑色斑大,背区变小,腹部色素变淡,背鳍、尾鳍和臀鳍上形成羽状色素斑,体长达 55.3 mm。孵化后 65 d 鱼苗体长达到 88.9 mm(图 2)。

2.3 杂交胚胎发育率

利用蓝身大斑石斑鱼冷冻精子与棕点石斑鱼卵杂交的受精率、孵化率和畸形率分别为(76.67±5.77)%、(85.67±5.13)%和(6.33±1.54)%,利用新鲜精子受精的受精率、孵化率和畸形率分别为(83.33±2.89)%、(86.67±5.77)%和(6.33±0.58)%,使用冷冻精子和新鲜精子无显著差异(图 3)。

2.4 杂交鱼苗的生长

通过对 180~370 日龄金虎斑鱼苗生长全长、体长和体重性状的测量,拟合了这一时期杂交鱼苗的生长方程: $W=0.0311L^{2.8079}$, $R^2=0.9886$,指数 $b=2.8079<3$,鱼苗处于异速生长时期(图 5)。220 日龄平均体重为(179.08±42.54) g,平均全长达(22.03±1.29) cm,平均体长为(21.96±1.22) cm,平均体高为(6.11±0.81) cm(图 4)。1 龄时,金虎斑平均体重达(559.76±80.85) g,全长达(32.58±1.60) cm,体长为(26.43±1.42) cm。通过在工厂化流水池养殖对比,1 龄金虎斑体重是珍珠龙胆的 1.63 倍,全长是 1.24 倍,金虎斑的生长速度显著快于珍珠龙胆(表 2)。

3 讨论

3.1 石斑鱼远缘杂交育种

在世界上石斑鱼约有 100 种,是分布在热带和亚热带海域的大型鱼类,少数分布在温带;在我国有

表 1 棕点石斑鱼(♀)×蓝身大斑石斑鱼(♂)杂交胚胎发育时序和特征
Tab.1 The development timing and characteristics of hybrid embryos of *E. fuscoguttatus*♀×*E. tukula*♂

发育时间 Development time (min)	胚胎时期 Embryo stage	发育特征 Development characteristics	图 Figures
0	受精卵	卵中具一大油球, 卵质透明	图 1.1
40	胚盘形成	在胚胎动物极形成一盘状突起	图 1.2
45	2 细胞	胚盘分裂为二	图 1.3
52	4 细胞	2 细胞纵裂为 4 细胞	图 1.4
65	8 细胞	4 细胞纵裂为 8 细胞	图 1.5
80	16 细胞	8 细胞横裂为 16 细胞	图 1.6
95	32 细胞	8 细胞等分裂为 32 细胞	图 1.7
108	64 细胞	32 细胞等分裂为 64 细胞	图 1.8
124	128 细胞	64 细胞分裂为 128 细胞	图 1.9
145	256 细胞	128 细胞分裂为 256 细胞	图 1.10
164	多细胞期	细胞球大量分裂, 分裂球无法分辨	
180	桑葚胚期	细胞球急骤增多, 似桑椹结构	
187	高囊胚期	囊胚突起, 呈一帽状	图 1.11
219	低囊胚期	囊胚细胞向四周扩展, 帽状体变低	图 1.12
263	原肠早期	胚层形成, 在囊胚四周翻卷成环状	图 1.13
349	原肠早中期	胚层向植物极下包至卵黄 2/5, 胚盾出现, 在原肠一侧出现一盾形结构	图 1.14
380	原肠中期	原肠下包至卵黄 1/2, 胚盾更加清晰	图 1.15
393	原肠中后期	原肠下包近 4/5, 胚盾在一侧呈条状, 头部开始变粗	图 1.16
442	原肠后期	原肠在植物极形成圆形胚孔, 胚盾加粗	图 1.17
461	胚孔封闭期	胚孔封闭, 胚体形成、变粗	图 1.18
477	胚体形成	胚孔消失, 胚体加长, 神经脊开始形成, 胚体中间出现一管状结构	图 1.19
505	胚体形成	胚体头端加粗, 尾部形成一透明小圆球, 似克氏囊初步形成	
543	胚体形成	胚体加长, 头部两侧膨大, 视泡原基形成, 神经脊完全形成, 胚体背面形成一管状结构	图 1.20
577	视泡形成	视泡突起, 脊索明显, 尾部末球出现, 胚体中部腹侧出现肌节 4-5 节	图 1.21
595	耳囊形成	在视泡后侧耳囊突起, 同时形成 8 对肌节	图 1.22
620	肌节期	肌节持续分化达到 9~10 节, 克氏囊呈球状附于胚体尾腹部	图 1.23
634	肌节期	肌节数达 11~12 节, 尾部开始伸长	图 1.24
673	脑泡形成	15~16 对肌节, 视泡、耳囊明显膨大, 脑室形成	图 1.25,26
688	尾芽期	18~19 对肌节, 尾部开始向一侧偏转	图 1.27
743	晶体、耳石形成	晶体、耳石明显形成, 脑室分化完整	图 1.28
800	心包形成	头部后腹面形成心包突起, 胚体长度约为卵周长的 1/2	图 1.29
938	胚体抽动	胚体形成间歇性抽动	图 1.30
971	胚体抽动	胚体约为卵周长的 8/12, 胚体抽动频率增加, 大约 20 次/min	图 1.31
977	心跳期	心脏开始间歇性跳动, 间歇时间约 24-40 s, 在跳动期 1 min 大约跳动 98 次, 跳动约 103 次后间歇一次, 此时肌节发育到 23 对	图 1.32
1018	胚体转动期	心跳仍有间歇性停止现象, 但时间缩短到 17 s 左右, 心率大约 93 次/min, 胚体开始间歇性转动	图 1.33
1027	孵化期	鱼苗出膜, 心跳间歇性跳动现象消失, 刚孵化鱼苗卵黄囊长度约为鱼苗长度的 2/3, 尾部不能完全伸直	图 1.34
1037	孵化鱼苗	孵化后 10 h 鱼苗, 尾部伸直变长, 卵黄囊约为体为 1/2	图 1.35

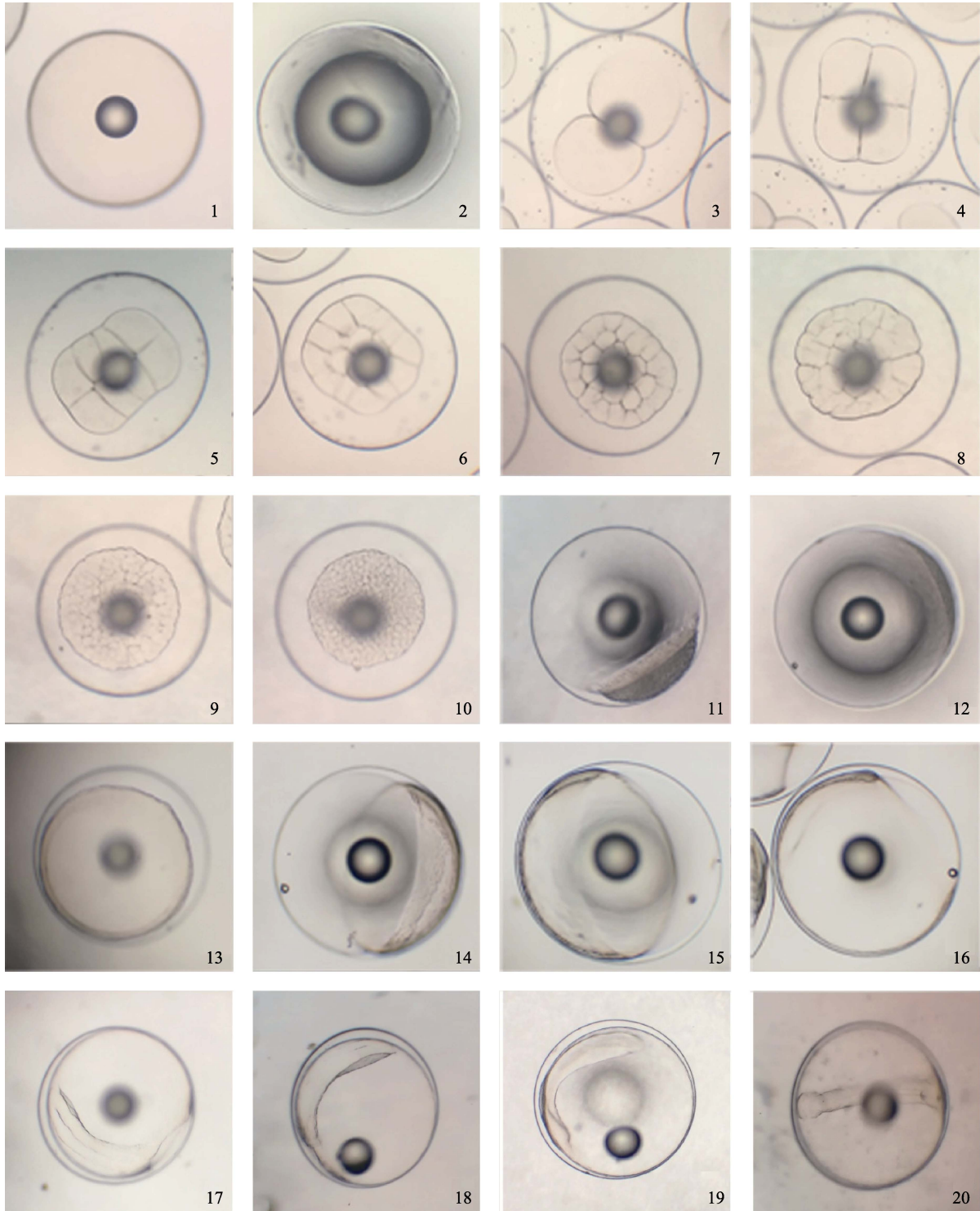


图1 棕点石斑鱼(♀)×蓝身大斑石斑鱼(♂)杂交胚胎发育(×40)

Fig.1 The development characteristics of hybrid embryos of *E. fuscoguttatus*♀×*E. tukula*♂(×40)

- 1: 受精卵; 2: 胚盘形成; 3: 2细胞; 4: 4细胞; 5: 8细胞; 6: 16细胞; 7: 32细胞; 8: 64细胞; 9: 128细胞; 10: 256细胞;
 11: 高囊胚; 12: 低囊胚; 13: 原肠早期; 14: 原肠早中期; 15: 原肠中期; 16: 原肠中后期; 17: 原肠后期;
 18: 胚孔封闭; 19: 胚体形成; 20: 胚体头部膨大
- 1: Fertilized egg; 2: Blastoderm formation; 3: 2-cell; 4: 4-cell; 5: 8-cell; 6: 16-cell; 7: 32-cell; 8: 64-cell; 9: 128-cell;
 10: 256-cell; 11: High blastocyst; 12: Low blastocyst; 13: Early phase of gastrocoele; 14: Early-meta phase of gastrocoele;
 15: Metaphase of gastrocoele; 16: Meta-anaphase of gastrocoele; 17: Anaphase of gastrocoele;
 18: Blastopore closed; 19: Embryo formation; 20: Embryo's head bulges

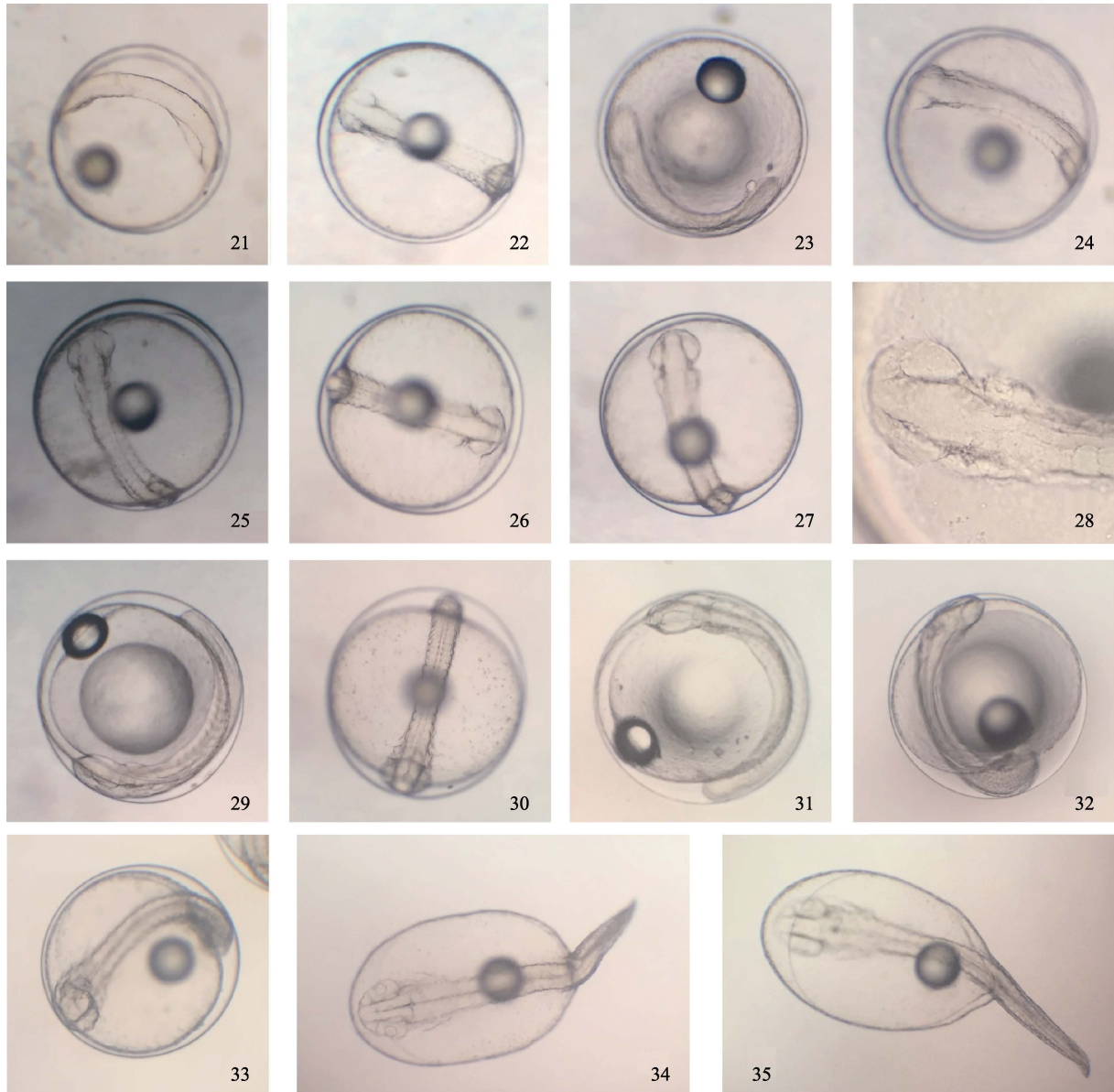


图 1(续) 棕点石斑鱼(♀)×蓝身大斑石斑鱼(♂)杂交胚胎发育(×40)

Fig.1 (continued) The development characteristics of hybrid embryos *E. fuscoguttatus* ♀ × *E. tukula* ♂ (×40)

21: 视泡形成; 22: 耳囊形成; 23: 克氏囊形成; 24: 11~12 对肌节发育; 25: 15~16 对肌节; 26: 脑泡形成;
27: 18~19 对肌节, 尾芽偏转; 28: 晶体、耳石形成×100; 29: 心包形成; 30: 胚体抽动; 31: 胚体约为
卵周长的 8/12; 32: 心跳期; 33: 胚体转动; 34: 初孵鱼苗; 35: 孵化后 10 h

21: Optic vesicle formation; 22: Otic capsule formation; 23: Gram sac formation; 24: 11~12 pairs muscle development;
25: 15~16 pairs muscle; 26: Brain vesicle formation; 27: 18~19 pairs muscle; tail bud deflection; 28: Crystals and otoliths are
formed×100; 29: Heart-sac formation; 30: Embryonic body twitch; 31: The embryo is about 8/12 of the circumference of
the egg; 32: Heartbeat period; 33: Embryo turn; 34: Newly-hatched fry; 35: 10 h post hatching

36 种石斑鱼(孟庆闻等, 1995), 2016 年, 石斑鱼捕捞量达 128538 t, 养殖产量达 108319 t(农业部渔业渔政管理局编制, 2016)。目前, 主要石斑鱼养殖品种有云纹石斑鱼(*E. moara*)、棕点石斑鱼、褐点石斑鱼(*E. fuscoguttatus*)、斜带石斑鱼(*E. coioides*)、鞍带石斑鱼(*E. lanceolatus*)及杂交品种等 10 多个种。但是在养殖过程中纯种石斑鱼苗种成活率低、畸形率高、病

害多这一现象, 一直影响着石斑鱼产业的发展, 因此, 人们一直在探索解决这一问题的有效途径。

杂交育种可使不同品种或品系的优良性状发生遗传组合, 达到改良鱼类性状的目的, 培育出优良养殖品种。国内外一些石斑鱼养殖者对石斑鱼的杂交苗种培育进行了多种尝试, 例如, 地中海石斑鱼(*E. costae*)×东大西洋石斑鱼(*E. marginatus*) (Glamnzina *et al*,

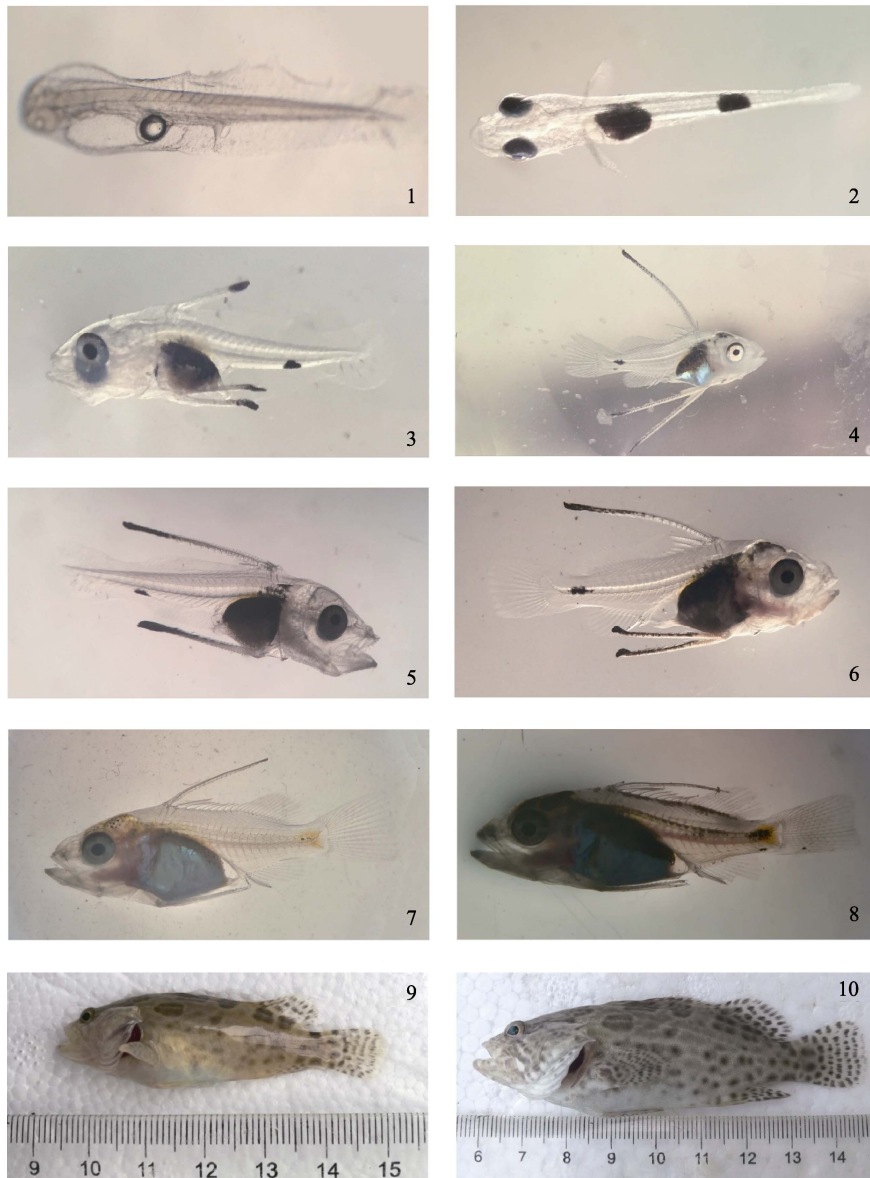


图2 棕点石斑鱼(♀)×蓝身大斑石斑鱼(♂)杂交鱼苗变态发育

Fig.2 Metamorphosis development of hybrid juvenile fish *E. fuscoguttatus* ♀ × *E. tukula* ♂

- 1: 孵化后 2 d (×40); 2: 孵化后 5 d (×40); 3: 孵化后 10 d (×5); 4: 孵化后 15 d (×3); 5: 孵化后 20 d 鱼苗×3;
6: 孵化后 25 d (×3); 7: 孵化后 30 d (×3); 8: 孵化后 35 d (×3); 9: 孵化后 45 d (×1); 10: 孵化后 65 d (×1)
1: 2 d post hatching (×40); 2: 5 d post hatching (×40); 3: 10 d post hatching (×5); 4: 15 d post hatching (×3);
5: 20 d post hatching (×3); 6: 25 d post hatching×3; 7: 30 d post hatching (×3); 8: 35 d post hatching (×3);
9: 45 d post hatching (×1); 10: 65 d post hatching (×1)

2001)、斜带石斑鱼(*E. coioides*)♀×赤点石斑鱼(*E. akaara*)♂(刘付永忠等, 2007)、斜带石斑鱼♀×鞍带石斑鱼(*E. lanceolatus*)♂(杨少森, 2010)、云纹石斑鱼♀×七带石斑鱼(*E. septemfasciatus*)♂(李炎璐等, 2015)、棕点石斑鱼♀×鞍带石斑鱼♂(陈超等, 2014)、云纹石斑鱼♀×鞍带石斑鱼♂(田永胜等, 2017a)等杂交苗种培育, 但大部分杂交后代畸形率高、成活率低, 在生产中未能被大量养殖应用, 目前仅有“虎龙杂交

斑”(张海发等, 2014)和“云龙石斑鱼”(田永胜等, 2017b)在生产中得到了大量推广养殖, 为石斑鱼养殖产业发展发挥了重要作用。蓝身大斑石斑鱼在自然环境中的种群数量较少, 具有生长快的优势, 是近年来新开发的养殖品种, 但由于人工繁殖和苗种培育技术还远未成熟, 在市场上出售的苗种数量相当少, 未形成产业优势。另外, 国际上对蓝身大斑石斑鱼研究报道很少, 对其养殖生物学特点及遗传性状的了解也

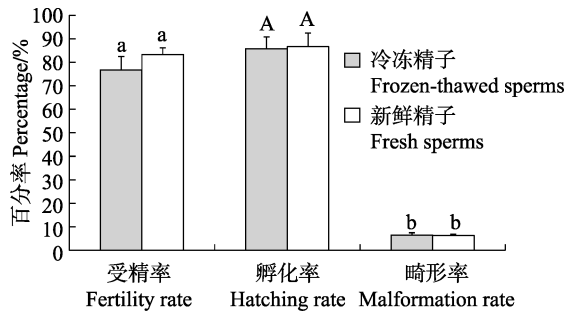


图 3 蓝身大斑石斑鱼冷冻精子与新鲜精子受精率、孵化率和畸形率比较(n=3, P<0.05)

Fig.3 The comparison of the rate of fertilization, hatching rate and malformation rate of frozen sperm and fresh sperm of *E. tukula*

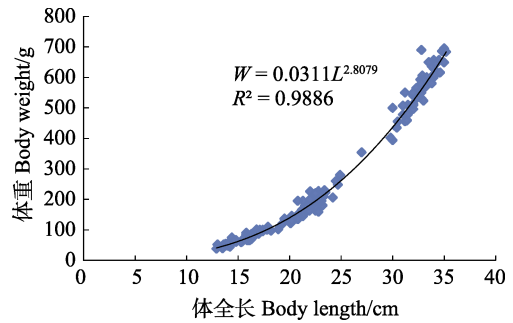


图 5 棕点石斑鱼(♀)×蓝身大斑石斑鱼(♂)杂交鱼苗生长曲线

Fig.5 Growth curve of the hybrid juvenile fish of *E. fuscoguttatus*♀×*E. tukula*♂



图 4 220 d 棕点石斑鱼(♀)×蓝身大斑石斑鱼(♂)杂交鱼苗
Fig.4 Hybrid juvenile fish of *E. fuscoguttatus*♀ ×*E. tukula*♂ at 220 d

相当有限。国际上对棕点石斑鱼的研究较早, 养殖技术也相对成熟, 1992 年, 日本开始对棕点石斑鱼进行人工繁殖研究(王涵生, 1997), 目前利用微卫星可以对繁殖群体进行跟踪管理(Lo *et al.*, 2008), 并对虎龙杂交斑的分子遗传特性进行分析(Huang *et al.*, 2015)。但是, 还未见利用蓝身大斑石斑鱼冷冻精子与棕点石斑鱼卵进行杂交育种的研究报道。本研究对蓝身大斑石斑鱼的精子冷冻保存技术进行了研究, 建立了其精子冷冻库, 实现了不同品种之间的异地受精繁育。

表 2 1 龄棕点石斑鱼(♀)×蓝身大斑石斑鱼(♂)杂交斑与珍珠龙胆生长对比

Tab.2 Growth comparison of *E. fuscoguttatus* ♀×*E. tukula*♂ and *E. fuscoguttatus*♀×*E. lanceolatus*♂ at one-year-old

	体重 Weight (g)	全长 Full length (cm)	体长 Body length (cm)	头长 Head length (cm)	体高 Body height (cm)
金虎斑 E.FT	559.76±80.85	32.58±1.60	26.43±1.42	10.63±0.78	8.76±0.59
珍珠龙胆 E.FL	343.05±52.56	26.24±1.32	21.23±0.92	8.93±0.47	7.46±0.49

3.2 杂交胚胎发育

对杂交后代胚胎发育进行研究可以直接判断杂交后代发育生物学性状, 检测两种鱼类品种杂交可育的可行性。大部分鱼类胚胎的发育过程大体上被划分为细胞分裂期、囊胚期、原肠期、神经胚期、肌节期、尾芽期、心跳期、孵化前期和出膜期, 但每一种鱼类胚胎的细胞分裂方式和速度、组织分化和器官形成时间、发育进程等也各具特点。鞍带石斑鱼受精卵在水温(29±0.5)℃条件下经过 18 h 30 min 完成胚胎发育(周玲等, 2010)。棕点石斑鱼在水温 26.5℃~28.0℃条件下历时 1325 min 完成胚胎发育(林彬等, 2010)。棕点石斑鱼卵与蓝身大斑石斑鱼冷冻精子杂交胚胎的发育经过卵裂、囊胚、原肠、脊索、神经、视听器官、肌节、心跳、胚体转动等时期的发育, 在 30℃经过 1037 min 完成胚胎发育, 杂交后代的发育时间明显较母本快。在云纹石斑鱼(♀)与鞍带石斑鱼♂杂交胚胎发

育中也发现杂交后代胚胎发育较母本快 1 h 现象(Chen *et al.*, 2018)。这两种杂交的父本都为生长快、体型大的鞍带石斑鱼和蓝身大斑石斑鱼, 可能是父本的生长快遗传基因促进了胚胎的生长, 提高了胚胎发育的速度。

本研究为了揭示杂交后代的发育特征, 对棕点石斑鱼卵与蓝身大斑石斑鱼冷冻精子杂交胚胎的发育过程进行详细观察, 发现原肠早期在胚层一侧就形成了胚体初形——胚盾, 脊索发育早期—神经管在胚孔封闭时也开始出现, 在视泡和耳囊发育的同时, 克氏囊(末球)也开始形成, 这些现象在其他鱼类胚胎发育中从未有过描述。以往的文献对鱼类胚胎发育过程人为进行了划分, 但其胚胎发育过程在各个时期并没有严格的界线, 比如视泡发育同时肌节也开始出现。肌节发育是胚胎最明显的特征, 当肌节 15~16 对时, 脑泡形成, 18~19 对肌节时, 尾部开始向一侧偏转, 表

示进入了尾芽期,因此,作者认为,以肌节数量为量化指标对胚胎发育进程作描述,可以更清楚地了解胚胎发育的进展。

本研究发现,胚胎在心脏跳动之前胚体先开始抽动,当肌节发育到23对时,心脏开始间歇性的跳动,初期间歇时间较长,发育到1018 min时,间歇时间变短,之后间歇性现象消失,心跳频率达到93次/min,这些现象在以往鱼类胚胎发育资料中都未有记载。

3.3 变态发育和生长

变态发育普遍存在于鲆鲽鱼类和石斑鱼类中,一个多世纪以来,比目鱼类变态发育和外形不对称引起人们的广泛兴趣,鲍宝龙等(2012)对比目鱼眼睛移位的组织学模型和眼睛移位信号调控途径等进行了研究,近年通过比较基因组学和转录组学对牙鲆变态发育进行了研究,认为甲状腺素、视黄酸信号在眼睛转移中具有决定性作用(Shao *et al.*, 2017)。石斑鱼变态发育的典型特征是背鳍棘和腹鳍棘的生长和退化,三叉棘的形成和退化在石斑鱼发育中具有生态适应性,但三叉棘在发育史中的意义还未见相关报道。斜带石斑鱼仔鱼变态过程与甲状腺细胞生成和活动密切相关,变态高峰期甲状腺细胞活动也十分活跃,变态后期甲状腺活动也减弱(唐啸尘等, 2010)。*E. marginatus* 幼鱼在全长2.9 mm时形成背鳍棘,5.5 mm时形成腹鳍棘,13.8 mm幼鱼变态完成,26.8 mm开始营定居生活(Cunha *et al.*, 2013)。本研究中杂交石斑鱼幼鱼在全长3 mm时形成背鳍棘和腹鳍棘,全长21.5 mm时三叉棘退化,完成变态发育,55.3 mm时表型特征与成体相似。本文杂交石斑鱼完成变态发育的体长大于Dusky grouper,可见杂交石斑的生长速度比较快,具有明显的杂交优势。

云纹石斑鱼(*Epinephelus moara*♀)和赤点石斑鱼(*E. akaara*♂)杂交受精率、孵化率和畸形率分别为87.3%、91.6%和9.5%(杨求华等, 2014)。虎龙杂交斑是目前石斑鱼中养殖最普遍的杂交品种,杂交受精率97%,孵化率为81%,苗种成活率为5%~10%(张海发等, 2014)。本研究中,金虎斑的受精率、孵化率分别为76.67%和86.67%,杂交后代畸形率相当低,仅为6.33%左右,而且杂交后代生长速度快,65 d鱼苗生长全长达8.89 cm;5个月生长全长达17 cm,体重达150 g;1龄时全长达32.58 cm,体重达559.76 g,生长最快的全长达34.18 cm,体重达640.61 g。珍珠龙胆发育至70 d时,幼鱼平均全长为7.55 cm(李炎璐等, 2015),5月龄体长为17 cm,体重为100 g;1龄时全长达26.24 cm,体重达343.05 g;1龄金虎斑体

重是珍珠龙胆的1.63倍。可见利用蓝身大斑石斑鱼和鞍带石斑鱼雄鱼分别与棕点石斑鱼雌鱼杂交,蓝身大斑石斑鱼为父本的杂交后代在生长方面具有更显著的杂交优势,是一个具有养殖前景的杂交种。

3.4 杂交遗传基础

棕点石斑鱼核型为 $2n=48(48t)$,NF为48(舒虎等, 2012),蓝身大斑石斑鱼染色体核型为 $2n=48t$,2种鱼的染色体属于石斑鱼属中典型的高位类原始类群,是进化过程中出现较早的物种(刘苏等, 2017)。另外,从其胚胎发育、变态发育和鱼苗的生长方面也可以证明,2种鱼在杂交育种中不存在任何遗传障碍,杂交后代与亲本在分子基础上的遗传研究还在开展中,之后将逐步为2种鱼的杂交育种提供丰富的遗传佐证。

本研究通过对蓝身大斑石斑鱼冷冻精子与棕点石斑鱼杂交受精卵胚胎发育、变态发育,受精率、孵化率和畸形率研究,以及杂交后代的生长比较分析,说明以上2种石斑鱼在遗传上具有较高的相似性,完全可以实现杂交育种,而且杂交后代体色趋同性强,具有明显的生长快的杂交优势,是一个具有推广养殖前景的新杂交种,本研究结果为以上2种石斑鱼杂交育种提供了一定的遗传依据。

参 考 文 献

- Bao BL. The eye migration and evolutionary origin of flatfish asymmetry. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2012, 21(5): 728-737 [鲍宝龙. 比目鱼类的眼睛移位和不对称的进化起源. *上海海洋大学学报*, 2012, 21(5): 728-737]
- Chen C, Kong XD, Li YL, *et al.* Embryonic and morphological development in the larva, juvenile, and young stages of *Epinephelus fuscoguttatus* (♀)×*E. lanceolatus* (♂). *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(5): 135-145 [陈超, 孔祥迪, 李炎璐, 等. 棕点石斑鱼(♀)×鞍带石斑鱼(♂)杂交子代胚胎及仔稚幼鱼发育的跟踪观察. *渔业科学进展*, 2014, 35(5): 135-145]
- Chen ZF, Tian YS, Wang PF, *et al.* Embryonic and larval development of a hybrid between kelp grouper *Epinephelus moara*♀×giant grouper *E. lanceolatus*♂ using cryopreserved sperm. *Aquaculture Research*. 2018, 1-7. DOI: 10.1111/are.13591
- Cunha ME, Ré P, Quental-Ferreira H, Gavaia PJ, *et al.* Larval and juvenile development of dusky grouper *Epinephelus marginatus* reared in mesocosms. *Journal of Fish Biology*, 2013, 83(3): 448-465
- Fisheries and Fisheries Administration Bureau of the Ministry of

- Agriculture. 2016 yearbook of fishery statistics of China. Beijing: China Agriculture Press, 2016, 5 [农业部渔业渔政管理局. 2016年中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2016, 5]
- Fu SY, Liu JY, Wang YB, *et al.* Study on the model of pond net box culture of brown spot grouper. Fisheries Science and Technology Information, 2013, 40(2): 64–65 [符书源, 刘金叶, 王永波, 等. 棕点石斑鱼池塘网箱养殖模式研究. 水产科技情报, 2013, 40(2): 64–65]
- Glamnina B, Glavić N, Skaramuca B, *et al.* Early development of the hybrid *Epinephelus costae*♀×*E. marginatus*♂. Aquaculture, 2001, 198(1–2): 55–61
- Huang YS, Li ZB, Ning YF, *et al.* Isolation and characterization of microsatellite loci in hybrid giant tiger grouper. Genetics and Molecular Research, 2015, 14(4): 14706–14710
- Kai YH, Su HM, Tai KT, *et al.* Vaccination of grouper broodfish (*Epinephelus tukula*) reduces the risk of vertical transmission by nervous necrosis virus. Vaccine, 2010, 28(4): 996–1001
- Li YL, Chen C, Wang QY, *et al.* Comparative analysis of growth characteristics between hybrid F₁ by *Epinephelus moara* (♀) × *Epinephelus septemfasciatus* (♂) and the offspring of their parents. Progress in Fishery Sciences, 2015, 36(3): 42–49 [李炎璐, 陈超, 王清印, 等. 云纹石斑鱼(*E. moara*) (♀) × 七带石斑鱼(*E. septemfasciatus*) (♂) 杂交 F₁ 生长特征与其亲本子代的比较. 渔业科学进展, 2015, 36(3): 42–49]
- Lin B, Huang ZW, Luo J, *et al.* Embryonic development observation of *Epinephelus fuscoguttatus*. Journal of Hainan Normal University (Natural Science), 2010, 23(1): 87–93 [林彬, 黄宗文, 骆剑, 等. 棕点石斑鱼胚胎发育的观察. 海南师范大学学报(自然科学版), 2010, 23(1): 87–93]
- Liu L, Zhang Y, Chen C, *et al.* Preparation of chromosomes and analysis of karyotypes of hybrid F₁ (*Epinephelus fuscoguttatus*♀×*Epinephelus lanceolatus*♂) groupers. Progress in Fishery Sciences, 2016, 37(2): 33–41 [刘莉, 张岩, 陈超, 等. 棕点石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus*♀) × 鞍带石斑鱼(*Epinephelus lanceolatus*♂) F₁ 染色体制备方法及其核型分析. 渔业科学进展, 2016, 37(2): 33–41]
- Liu S, Yang Y, Zhang HF, *et al.* The karyotype of *Epinephelus tukula*. Marine Sciences, 2017, 41(12): 46–51 [刘苏, 杨宇, 张海发, 等. 蓝身大斑石斑鱼染色体核型分析. 海洋科学, 2017, 41(12): 46–51]
- Liufu YZ, Zhao HH, Liu XC *et al.* Preliminary study on the hybrid red-spotted grouper (*Epinephelus akaara*)♂×Orange spotted grouper(*E. coioides*)♀. 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. 中山大学学报(自然科学版), 2007, 46(3): 72–75]
- Lo LC, Yue GH. Microsatellites for broodstock management of the tiger grouper, *Epinephelus fuscoguttatus*. Animal Genetics, 2008, 39(1): 90–91
- Meng QW, Su JX, Miao XZ. Fishes Taxonomy. Beijing: China Agriculture Press, 1995, 606–622 [孟庆闻, 苏锦祥, 缪学祖. 鱼类分类学. 北京, 中国农业出版社, 1995, 606–622]
- Shao CW, Bao BL, Xie ZY, *et al.* The genome and transcriptome of Japanese flounder provide insights into flatfish asymmetry. Nature Genetics, 2017, 49(1): 119–124
- Shen SX. Establishment of hatchery and broodstock techniques of potato grouper, *Epinephelus tukula*. NTOU: Department of Aquaculture, 2011, 6: 28 [沈士新. 蓝身大石斑(*Epinephelus tukula*) 种苗繁殖及育成技术之研究. 台湾海洋大学: 水产养殖学系, 2011, 6: 28]
- Shu H, Wei QL, Luo LJ, *et al.* Karyotypes analysis of four grouper fishes from coastal waters of Guangdong. Guangdong Agricultural Sciences, 2012(8): 124–128 [舒虎, 魏秋兰, 罗丽娟, 等. 广东沿海4种石斑鱼的染色体组型分析. 广东农业科学, 2012(8): 124–128]
- Song ZX, Chen C, Zhai JM, *et al.* Biological characteristics and progress of artificial breeding technique for kelp bass, *Epinephelus moara*. Fishery Information and Strategy, 2012, 27(1): 47–54 [宋振鑫, 陈超, 翟介明, 等. 云纹石斑鱼生物学特性及人工繁育技术研究进展. 渔业信息与战略, 2012, 27(1): 47–54]
- Tian YS, Jiang J, Wang N, *et al.* Sperm of the giant grouper: Cryopreservation, physiological and morphological analysis and application in hybridizations with red-spotted grouper. Journal of Reproduction and Development, 2015, 61(4): 333–339
- Tian YS, Chen ZF, Duan HM, *et al.* The family line establishment of the hybrid *Epinephelus moara*(♀)×*E. lanceolatus*(♂) by using cryopreserved and the related genetic effect analysis. Journal of Fisheries of China, 2017a, 41(12): 1807–1819 [田永胜, 陈张帆, 段慧敏, 等. 鞍带石斑鱼冷冻精子与云纹石斑鱼杂交家系建立及遗传效应. 水产学报, 2017a, 41(12): 1807–1819]
- Tian YS, Duan HM, Tang J, *et al.* Analysis of phenotypic quantitative traits of kelp grouper, giant grouper and hybrid progeny. Journal of Shanghai Ocean University, 2017b, 26(6): 808–818 [田永胜, 段会敏, 唐江, 等. 石斑鱼杂交种“云龙斑”与亲本的表型数量性状判别分析. 上海海洋大学学报, 2017b, 26(6): 808–818]
- Tang XC, Liu XC, Lin HR. The development of thyroid of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) larvae during metamorphosis. Acta Hydrobiologica Sinica, 2010, 34(1): 210–215 [唐啸尘, 刘晓春, 林浩然. 斜带石斑鱼仔鱼变态

- 过程中甲状腺的发育变化. 水生生物学报, 2010, 34(1): 210–215]
- Wang HS. The problems and situation in the artificial propagation of grouper, *Epinephelus*. Journal of Dalian Fisheries University, 1997, 12(3): 44–51 [王涵生. 石斑鱼 *Epinephelus* 人工繁殖研究的现状与存在问题. 大连水产学院学报, 1997, 12(3): 44–51]
- Wang JG, Qiao ZG, He QH. Study on artificial seedling technology of the brown grouper. Scientific Fish Farming, 2008(7): 25–26 [王建钢, 乔振国, 何启惠. 棕点石斑鱼人工育苗技术研究. 科学养鱼, 2008(7): 25–26]
- Yang QH, Huang ZC, Zheng LY, et al. Embryonic development and growth of hybrid from the hybridization of *Epinephelus moara*(♀)×*E. akaara*(♂). Marine Fisheries, 2014, 36(3): 224–232 [杨求华, 黄种持, 郑乐云, 等. 云纹石斑鱼(♀)×赤点石斑鱼(♂)杂交子代胚胎发育及生长. 海洋渔业, 2014, 36(3): 224–232]
- Yang SS. Crossbreeding of *Epinephelus coioides*♀ and *E. lanceolatus*♂ and genetic analysis of the hybrid. Master's Thesis of South China Normal University, 2010 [杨少森. 斜带石斑鱼♀与鞍带石斑鱼♂杂交及 F₁ 遗传分析. 华南师范大学硕士研究生学位论文, 2010]
- Yang Y, Xie Z, Peng C, et al. The complete mitochondrial genome of the *Epinephelus tukula* (Perciformes, Serranidae). Mitochondrial DNA Part A DNA Mapping, Sequencing, and Analysis, 2016, 27(1): 520–522
- Yeh SL, Dai QC, Chu YT, et al. Induced sex change, spawning and larviculture of potato grouper, *Epinephelus tukula*. Aquaculture, 2003, 228(1–4): 371–381
- Yu HH, Li YL, Chen C, et al. Feeding habits and growth characteristics of larval, juvenile, and young F₁ of *Epinephelus fuscoguttatus* (♀)×*E. lanceolatus* (♂). 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. 中国水产科学, 2015, 22(5): 968–977]
- Zhang HF, Lin HR, Zhang Y, et al. Breeding method of hybrid "tiger dragon grouper". Patent number: ZL201010249402, 2014.03.05 [张海发, 林浩然, 张勇, 等. 杂交“虎龙斑”的培育方法. 专利号 ZL201010249402, 授权公告日 2014.03.05]
- Zhou L, Wen WM, Li JL, et al. Studies on embryonic development, morphological development and feed changeover of *Epinephelus lanceolatus* larva. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2010, 26(1): 293–302 [周玲, 翁文明, 李金亮, 等. 鞍带石斑鱼胚胎发育及仔鱼形态发育、饵料转变的观察研究. 中国农学通报, 2010, 26(1): 293–302]
- Zhou Y, Huan YL, Luo J, et al. Methylation-sensitive amplification polymorphism analysis of genomic DNA methylation on *Epinephelus lanceolatus*, *Epinephelus fuscoguttatus* and their hybrid generation. Journal of Hainan University (Natural Science), 2017, 35(2): 145–152 [周莹, 韩玉龙, 骆剑, 等. 鞍带石斑鱼、棕点石斑鱼及其杂交子代 DNA 甲基化的 MSAP 分析. 海南大学学报(自然科学版), 2017, 35(2): 145–152]

(编辑 冯小花)

Development and Growth of Hybrid Offspring of Brown Grouper *Epinephelus fuscoguttatus* (♀) × Blue Speckled Grouper *Epinephelus tulcula* (♂) Using Cryopreserved Sperm

TIAN Yongsheng^{1,2①}, TANG Jiang^{1,3}, MA Wenhui⁵, CHENG Meiling^{1,4}, LI Zhentong^{1,3}, WU Yuping^{1,4},
ZHANG Jingjing^{1,3}, WANG Linna^{1,2}, PANG Zunfang⁵, WANG Xiaomei⁵, ZHAI Jieming⁵

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Laboratory of Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory of Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071; 3. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 4. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023; 5. Laizhou Mingbo Aquatic Co., Ltd., Yantai 261400)

Abstract In the natural environment, there is reproductive isolation between *Epinephelus tulcula* and *E. fuscoguttatus* due to their different geographical distribution and reproduction time and temperature. In this study, we used frozen sperm from *E. tulcula* and eggs from *E. fuscoguttatus* for artificial insemination. The fertilized eggs were incubated in water at a temperature of 30°C and salinity of 20. The embryonic development and post-embryonic metamorphosis were observed in detail. The morphological characteristics and developmental times of hybrid offspring were observed using a microscope and dissecting mirror. We determined the fertilization rate, hatching rate, and deformity rate, and the fry growth parameters were measured. The results showed that the fertilized eggs completed embryo development 1037 maf (min after fertilization). Early in gastrula an embryonic shield was formed on one side of the germ layer, and the neural tube also began to appear when the blastopore was closed. Additionally, as the optic vesicle and the ear vesicle developed, the Kirschner's capsule (end ball) also developed. It was found that the embryoid twitch preceded the heartbeat. When the sarcomere developed to 23 pairs (977 maf), the heart began to beat intermittently at a rate of 98 beats/min and the interval of 24~40 s. The interval of the heartbeat reduced at 1018 maf with a heart rate of 93 beats/min, and then the intermittent phenomenon disappeared. These phenomena have not been documented in previously. The typical feature of metamorphosis is the growth and degeneration of the trigeminal spine. When the hybrid juvenile grew to 3 mm (10 daf, days after fertilization), it formed dorsal and pelvic pin spines. When the length reached 21.5 mm (35 daf), the trigeminal spine degenerated and the metamorphosis was complete. When hybrid juveniles grew to 55.3 mm (45 daf), their phenotypic characteristics were similar to that of the adult. The fertilization rate, hatching rate, and malformation rate of the frozen sperm were (76.67±5.77)%, (85.67±5.13)%, and (6.33±1.54)%, respectively, and there was no significant difference in these parameters when compared to those of fresh sperm ($P<0.05$). At the 65 daf, the body length of hybrid fry reached 8.89 cm. Then, the offspring of the hybrids tended to be more consistent in body color and they grew very fast. The average body length and body weight of hybrid fish were (32.58±1.60) cm and (559.76±80.85) g at one year old. By contrast farming, the weight of *E. fuscoguttatus*♀ × *E. tulcula*♂ was 1.63-fold of *E. fuscoguttatus*♀ × *E. lanceolatus*♂, and the total length of *E. fuscoguttatus*♀ × *E. tulcula*♂ was 1.24-fold of *E. fuscoguttatus*♀ × *E. lanceolatus*♂. The growth equation in this period was $W=0.0311L^{2.8079}$, $R^2=0.9886$. The results suggest that there is no genetic disorder in the hybrid embryos and post-embryonic development between *E. tulcula*♂ and *E. fuscoguttatus*♀. The offspring showed high fertility and hatching rate, but low malformation rate. Moreover, the offspring showed heterosis of rapid growth. The study provides a genetic basis for hybrid breeding and seed cultivation of these two grouper species.

Key words *Epinephelus tulcula*; *Epinephelus fuscoguttatus*; Crossbreeding; Embryo development; Metamorphosis; Survival rate

① Corresponding author: TIAN Yongsheng, E-mail: tianys@ysfri.ac.cn