

# 鞍带石斑鱼 *Epinephelus lanceolatus* 卵子的短期保存\*

魏千皓, 叶智锋, 王崇伟, 林浩然, 李水生, 张勇

有害生物控制与资源利用国家重点实验室 / 广东省水生经济动物良种繁育重点实验室 /  
中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275

**摘要:** 在水产养殖中, 建立体外保存卵子的方法对于人工授精和种苗生产具有重要的应用价值。鞍带石斑鱼 *Epinephelus lanceolatus* 是我国重要的水产养殖鱼类, 其受精卵价格昂贵。本研究探讨了保存条件 (保存介质、温度和 pH) 与添加剂 (鞍带石斑鱼血清、维生素预混料) 对于鞍带石斑鱼卵子短期保存的影响。结果表明, 22 °C 时, 卵子在 L-15 培养基 (pH=8.1) 中保存 2 h, 受精率和孵化率分别为 66.4% 和 47.9%。在此基础上, 添加鞍带石斑鱼血清和维生素预混料可以有效地延长保存时间, 卵子能维持较高的活力。在体外保存 8 h 后, 卵子的受精率和孵化率仍可达到 64.4% 和 44.8%。本研究通过优化改良, 建立了一种适合于鞍带石斑鱼卵子体外短期保存的体系, 有助于鞍带石斑鱼的育种工作和孵化管理。

**关键词:** 鞍带石斑鱼 *Epinephelus lanceolatus*; 卵子保存; 保存条件; 血清; 维生素

**中图分类号:** Q492 **文献标志码:** A **文章编号:** 2097-0137 (2022) 05-0062-06

## Short-term storage of eggs from giant grouper (*Epinephelus lanceolatus*)

WEI Qianhao, YE Zhifeng, WANG Chongwei, LIN Haoran, LI Shuisheng, ZHANG Yong

State Key Laboratory for Biocontrol and Institute of Entomology / Guangdong Provincial Key Laboratory for Aquatic Economic Animals / School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China

**Abstract:** Egg storage for fertilization and seed production has great significance in aquaculture. Giant grouper (*Epinephelus lanceolatus*) is an economically important aquaculture species in China, and its fertilized eggs are much expensive. In this study, we tried to develop an *in vitro* egg storage system in this species. Storage conditions such as medium, temperature and pH were experimentally investigated. Results showed that eggs stored in L-15 medium (pH=8.1) at 22 °C for 2 h showed a relatively high fertilization rate (66.4%) and a hatching rate (47.9%). With supplementation of giant grouper serum and vitamin premix into L-15 medium, the storage time was prolonged and eggs still retained a relatively high viability. The fertilization and hatching rates from eggs stored for 8 h were 64.4% and 44.8%, respectively. This optimized short-term egg storage system would facilitate breeding practice and hatchery management in giant grouper.

**Key words:** *Epinephelus lanceolatus*; egg storage; storage conditions; serum; vitamins

\* 收稿日期: 2021-10-17 录用日期: 2021-11-22 网络首发日期: 2022-01-21

基金项目: 2020 年省级乡村振兴战略专项资金 (渔业产业发展) (粤财农 [2020] 4);  
湛江湾实验室重大科研专项 (ZJW-2019-06)

作者简介: 魏千皓 (1997 年生), 男; 研究方向: 鱼类繁育; E-mail: weiqh3@mail2.sysu.edu.cn

通信作者: 张勇 (1978 年生), 男; 研究方向: 鱼类繁育; E-mail: lsszy@mail.sysu.edu.cn

鞍带石斑鱼 *Epinephelus lanceolatus* 隶属鲷形目, 鮨科, 石斑鱼属, 主要分布于印度-太平洋地区, 是大型的珊瑚礁鱼类。目前报道最大的鞍带石斑鱼个体长达 2.7 m, 体质量可达 400 kg<sup>[1]</sup>。鞍带石斑鱼生长速度快, 味道鲜美, 是我国和东南亚国家重要的海水养殖鱼类。然而, 鞍带石斑鱼人工繁殖难度大, 受精卵价格昂贵。近年来, 每公斤受精卵的价格在 3 万~6 万元之间, 仍供不应求。鞍带石斑鱼的卵子主要通过激素催产获得, 其活力在接触海水后迅速下降, 从而导致受精失败。配子保存是提高鱼类人工繁育效率的有效策略。目前, 鞍带石斑鱼精子的长期保存研究已经开展<sup>[2-3]</sup>。冷冻保存后的精子已应用于不同石斑鱼的种间杂交<sup>[4-5]</sup>。但是, 鞍带石斑鱼卵子保存的研究尚未见报道。

由于鱼类卵子的结构复杂, 很难像精子一样进行长期保存, 相较而言, 短期的体外保存是可行的途径。在金鱼、鲤鱼、虹鳟、小体鲟和梭鲈等鱼类中, 已经开展了卵子的短期保存研究<sup>[6-11]</sup>, 发现体外保存的卵子在数小时至数天内仍能保持较高的活力。对于生产和科研工作来说, 短期内保持卵子活力有助于人工授精和孵化管理, 可提高人工繁育的效率。为了保持鞍带石斑鱼卵子的活力和延长体外保存的时间, 本研究对卵子体外保存的条件进行研究, 建立适用于鞍带石斑鱼卵子体外保存的方法。

## 1 材料和实验

### 1.1 配子收集

鞍带石斑鱼的卵子采集于海南晨海水产有限公司感城养殖基地。于 2020 年 6~10 月, 选择处于生殖季节、腹部隆起、生殖孔红肿凸起的鞍带石斑鱼亲鱼 (10~12 龄, 体质量 60~70 kg), 在人工催产后, 通过挤压腹部使精子或卵子流出。将精液收集于 50 mL 离心管中, 然后 4 °C 储存直至使用。将卵子收集于干燥洁净的 500 mL 玻璃烧杯中, 然后分别放置于塑料培养皿中进行实验。

### 1.2 受精实验

将精子和卵子置于烧杯中轻轻混合, 然后加入过滤海水激活精子与卵子。3 min 后, 用干净的海水清洗受精卵两次, 然后转移至装有 10 L 的海水塑料桶中。在培育的过程中, 保持充气。培育 4 h 后, 待受精卵发育至囊胚期, 在解剖显微镜下观察, 计算受精率 [(受精率=(受精卵总数/卵子总

数)×100%,  $n = 1\ 000$  颗]。培育 20 h 后, 在解剖显微镜下观察, 计算孵化率 [孵化率=(孵化幼鱼总数/卵子总数)×100%,  $n = 1\ 000$  颗]。

### 1.3 实验设计

以逐步进行的方式设计了 6 个实验。每个实验设 3 个重复, 每个重复卵子总数为  $n = 1\ 000$  颗。

**1.3.1 卵子保存培养基的确定** 以无酚红的 Leibovitz's L-15 (L-15) 培养基、Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) 培养基、Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640) 培养基、DMEM 培养基作为基础保存液。以上培养基购买于武汉普诺赛生命科技有限公司。卵子和培养基大约按 1:6 的比例混合, 28 °C 放置 2 h, 然后检测卵子的受精率与孵化率。

**1.3.2 保存温度的测定** 根据实验 1 的结果, 将卵子置于 L-15 培养基中, 在不同温度 (16、22、28 和 32 °C) 下保存 2 h, 然后检测卵子的受精率与孵化率。

**1.3.3 培养基 pH 值的测定** 为了确定卵子保存的最佳培养基 pH 值, 根据实验 1 和 2 的结果, 将卵子分别放置在 pH 值为 7.4、7.8、8.1、8.5 的 L-15 培养基中。2 h 后, 检测卵子的受精率与孵化率。

**1.3.4 保存时间对卵子活力的影响** 根据实验 1、2 和 3 的结果, 将卵子保存在 22 °C 的 L-15 培养基 (pH=8.1) 中, 分别在不同的保存时间 (0、1、2、4 和 6 h) 后检测卵子的受精卵与孵化率。

**1.3.5 不同血清对卵子活力的影响** 为了延长卵子保存的时间, 将不同剂量的胎牛血清 (FBS, fetal bovine serum) 和鞍带石斑鱼血清 (GGS, giant grouper serum) 分别添加进 L-15 培养基 (pH=8.1) 中。然后, 将卵子置于含有血清的 L-15 培养基中, 22 °C 保存 4 h, 检测卵子的受精卵与孵化率。鞍带石斑鱼血液样品采集于处在繁殖季节的亲鱼, 4 °C 以  $8\ 000 \times g$  速度离心 15 min, 分离血清样品, 放置 -80 °C 冰箱储存。

**1.3.6 维生素预混料对卵子活力的影响** 基于上述的实验结果, 为了进一步延长卵子保存的时间, 将 20 mg/L 维生素预混料 (厦门惠盈动物科技有限公司) 添加入含有 0.1 μL/mL 鞍带石斑鱼血清的 L-15 培养基 (pH=8.1) 中。然后, 将卵子置于添加维生素的培养基中, 22 °C 时分别在 0、2、4、6 和 8 h 后检测卵子的受精率和孵化率。

## 1.4 统计分析

实验结果采用 SPSS 23.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) 进行统计分析。所有数据均表示为平均值 $\pm$ S. E. M.。百分比数据在反正弦变换后进行单因素方差分析检验各组之间差异性, 利用 Fisher 的最小显著性差异法 (LSD) 进行多重比较, 取  $P < 0.05$  为显著性标准。

## 2 结果与分析

### 2.1 卵子短期保存条件的优化

刚挤出来的卵子, 不经过保存立即授精, 其受精率和孵化率分别为 (75.6 $\pm$ 5.31)% 和 (59.7 $\pm$ 6.92)% (表 1)。而未受精的卵子在 28 °C 下直接暴露于空气中 2 h, 则完全失去活力。在 28 °C 下, 卵子在不同培养基中保存 2 h 后, 活力出现了显著下降, 受精率均低于 50% (表 1)。与在其他培养基中保存的卵子相比, 在 L-15 培养基中保存的卵子具有相对较高的受精率 [(44.2 $\pm$ 0.73)%] 和较高的孵化率 [(25.4 $\pm$ 2.42)%] (表 1); 表明 L-15 培养基可能更适合作为卵子保存的培养液。在 L-15 培养基中, 保存温度为 16 °C 和 22 °C 时, 卵子的受精率和孵化率明显高于 28 °C 和 32 °C 保存的卵子 (表 2)。由于卵子 22 °C 保存后的受精率和孵化率高于 16 °C 保存后的受精率和孵化率, 因此选择 22.0 °C 作为后续实验的保存温度。随着 pH 从 7.4 升高到 8.1, 受精率与孵化率有增加的趋势, 但是统计数值没有显著差异 (表 3)。然而, 由表 3 可知, 在培养基 pH=8.1 时, 保存后卵子的受精率和孵化率明显高于在 pH=8.4 时的受精率和孵化率。基于上述结果, 组合优化好的保存条件 (22 °C, pH=8.1 的 L-15 培养基), 对卵子体外保存的时间进行测试, 结果见图 1。图 1 显示, 卵子在保存液中 2 h 后, 其受精率和孵化率分别为 (66.4 $\pm$ 2.70)% 和 (47.9 $\pm$ 1.28)%; 4 h 后, 分别降至 (45.6 $\pm$ 2.05)% 和 (25.8 $\pm$ 1.67)%; 6 h 后, 分别降至 (25.3 $\pm$ 1.67)% 和 (11.6 $\pm$ 1.06)%。

### 2.2 添加剂对卵子短期保存的影响

为了延长卵子保存时间, 在 L-15 培养基中分别添加 FBS 和 GSS。如表 4 所示, 当添加 FBS 时, 几乎所有卵子都在保存 4 h 后失去活力。而添加 GSS 可以显著提高卵子的活力。在含有 0.1  $\mu$ L/mL GGS 的 L-15 培养基中, 保存 4 h 后的卵子的受精率与孵化率分别为 (67.6 $\pm$ 2.88)% 和 (46.3 $\pm$ 0.68)% (表 4)。将 20 mg/L 的维生素预混物添加进含有

表 1 鞍带石斑鱼卵子 28 °C 时在不同培养基中保存 2 h 后的受精率和孵化率<sup>1)</sup>

Table 1 Fertilization and hatching rates of giant grouper eggs stored in different media at 28 °C for 2 h

保存介质	受精率/%	孵化率/%
对照组	75.6 $\pm$ 5.31 <sup>a</sup>	59.7 $\pm$ 6.92 <sup>a</sup>
L-15 培养基	44.2 $\pm$ 0.73 <sup>b</sup>	25.4 $\pm$ 2.42 <sup>b</sup>
DMEM/F12 培养基	35.2 $\pm$ 3.00 <sup>c</sup>	17.7 $\pm$ 2.12 <sup>c</sup>
RPMI-1640 培养基	22.1 $\pm$ 1.70 <sup>d</sup>	10.0 $\pm$ 1.43 <sup>d</sup>
DMEM 培养基	20.8 $\pm$ 1.28 <sup>d</sup>	8.2 $\pm$ 0.53 <sup>d</sup>

1) 对照组在卵子离体后立即进行受精, 同列不同字母代表差异显著 ( $P < 0.05$ )。

表 2 温度对鞍带石斑鱼卵子在 L-15 培养基中保存 2 h 后的受精率和孵化率的影响<sup>1)</sup>

Table 2 Effects of temperatures on fertilization and hatching rates of giant grouper eggs stored in L-15 medium for 2 h

保存温度/°C	受精率/%	孵化率/%
16	54.5 $\pm$ 4.36 <sup>a</sup>	33.8 $\pm$ 3.83 <sup>a</sup>
22	59.7 $\pm$ 4.07 <sup>a</sup>	39.1 $\pm$ 3.9 <sup>a</sup>
28	44.2 $\pm$ 2.72 <sup>b</sup>	26.6 $\pm$ 0.47 <sup>b</sup>
32	40.5 $\pm$ 1.86 <sup>b</sup>	21.8 $\pm$ 1.62 <sup>b</sup>

1) 同列不同字母代表差异显著 ( $P < 0.05$ )。

表 3 鞍带石斑鱼卵子 22 °C 时在不同 pH 值的 L-15 培养基中保存 2 h 后的受精率和孵化率<sup>1)</sup>

Table 3 Effects of pH on fertilization and hatching rates of giant grouper eggs stored in L-15 medium at 22 °C for 2 h

保存液 pH 值	受精率/%	孵化率/%
7.40	58.9 $\pm$ 5.48 <sup>a</sup>	37.2 $\pm$ 1.59 <sup>a</sup>
7.80	62.6 $\pm$ 6.65 <sup>a</sup>	42.9 $\pm$ 3.90 <sup>ab</sup>
8.10	67.9 $\pm$ 2.45 <sup>ab</sup>	50.1 $\pm$ 6.98 <sup>b</sup>
8.50	54.1 $\pm$ 2.90 <sup>ac</sup>	33.0 $\pm$ 2.87 <sup>a</sup>

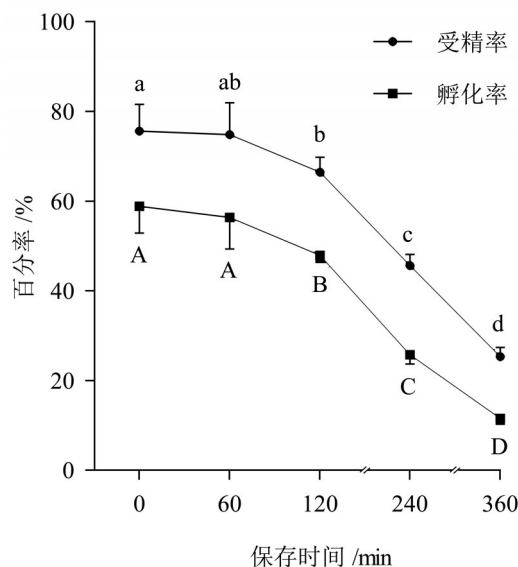
1) 同列不同字母代表差异显著 ( $P < 0.05$ )。

0.1  $\mu$ L/mL GGS 的 L-15 培养基中, 卵子保存的时间得到了明显地提高。在保存 8 h 后, 卵子的受精率和孵化率分别为 (64.4 $\pm$ 1.87)% 和 (44.8 $\pm$ 1.76)% , 与 4 h 和 6 h 时的数值没有显著性差异, 低于对照组 (图 2)。

## 3 讨论

### 3.1 卵子保存的基础培养基探讨

本研究首先对鞍带石斑鱼卵子体外保存的培养液进行探讨。L-15、DMEM/F12、RPMI-1640 和



不同字母表示不同保存时间的百分率有显著差异( $P < 0.05$ )。

图1 22 °C L-15培养基(pH=8.1)中, 卵子不同保存时间后的受精率与孵化率

Fig. 1 The fertilization and hatching rates of giant grouper eggs at different storage time points in L-15 medium (pH=8.1) at 22 °C

表4 鞍带石斑鱼卵子22 °C时在含不同血清的 L-15培养基中保存4 h后的受精率和孵化率<sup>1)</sup>

Table 4 Effects of sera supplementation on fertilization and hatching rates of giant grouper eggs stored in L-15 medium at 22 °C for 4 h

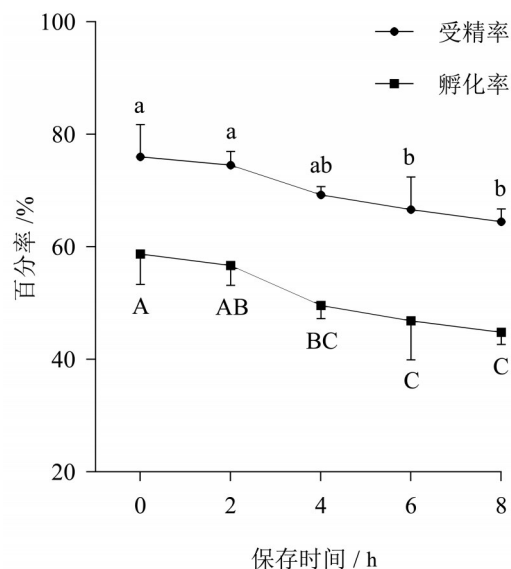
添加血清种类及质量浓度	受精率/%	孵化率/%
1 μL/mL FBS	0.5±0.08 <sup>a</sup>	0.00
0.1 μL/mL FBS	2.3±0.42 <sup>b</sup>	0.00
1 μL/mL GGS	53.8±1.32 <sup>c</sup>	31.8±1.90 <sup>a</sup>
0.1 μL/mL GGS	67.6±2.88 <sup>d</sup>	46.3±0.68 <sup>b</sup>
对照组 (不添加血清)	47.2±3.56 <sup>e</sup>	25.7±2.54 <sup>c</sup>

1) 同列不同字母代表差异显著 ( $P < 0.05$ )。

DMEM培养基常用于动物细胞培养。我们对这4种培养基进行了测试, 结果表明, 卵子保存在L-15培养基中具有较高的受精率和孵化率(表1)。L-15是鱼类卵母细胞培养常用的培养基, 具有维持卵母细胞活力的功能<sup>[12-14]</sup>。我们先前的研究亦表明, 在L-15培养基中, 斜带石斑鱼的卵泡经类固醇激素诱导后可以发生发泡破裂; 卵母细胞可以正常恢复第一次减数分裂<sup>[15-16]</sup>。这些研究表明, L-15可用为石斑鱼卵子保存的基础培养基。

### 3.2 温度和pH对卵子保存的影响

温度是影响卵子保存效率的关键因素。不同



不同字母表示不同保存时间的百分率有显著差异( $P < 0.05$ )。

图2 22 °C L-15培养基(pH=8.1)添加鞍带石斑鱼血清和维生素预混料后, 卵子不同保存时间后的受精率和孵化率

Fig. 2 The fertilization and hatching rates of giant grouper eggs at different storage time points in L-15 medium (pH=8.1) with supplementation GGS and vitamin premix at 22 °C

鱼类的卵子对保存温度的要求有很大的差别。有研究推测, 保存温度可能与鱼类栖息地的温度有关。冷水性鱼类的卵子比暖水性鱼类的卵子更能耐受较低的保存温度<sup>[8, 17-18]</sup>。鞍带石斑鱼是一种热带鱼类。在海南省, 其繁殖最适水温为28~32 °C。我们的结果表明, 当保存温度为16 °C和22 °C时, 卵子拥有较高的受精率和孵化率。因此, 鞍带石斑鱼卵子保存的适合温度为16~22 °C。卵子保存的最适温度低于养殖的最适温度的现象在其他鱼类中也被观察到。例如, 小体鲷亲鱼在15 °C下养殖, 但卵子保存的适合温度在7~11 °C<sup>[8]</sup>。克林雷氏鲶的卵母细胞保存温度为15 °C, 但亲鱼繁殖的水温为25 °C<sup>[19]</sup>。目前, 关于卵子保存温度低于亲本养殖温度的原因仍然未知。我们推测较低的温度可能会降低卵细胞内的代谢活动, 从而有助于维持卵子的活力。多项研究发现, pH值的变化也会影响体外保存的卵子的活力<sup>[10, 20-21]</sup>。虹鳟卵子在pH=8.2的培养基中保存3 d后的受精率高于在pH=9和pH=10的培养基中<sup>[10]</sup>。我们的研究发现, 当卵子保存在pH=8.5的L-15培养基中, 其活力显著降低, 但在pH为7.4、7.8和8.1的培养基中, 卵子的受精率和孵化率差异不显著(表3)。由于pH为8.1时, 保存后卵子的受精率和孵化率最高, 因此建议鞍带石斑鱼卵子保存在pH=8.1的培养基

中。根据优化的保存条件,在 22 °C 下,卵子在 L-15 培养基 (pH=8.1) 中保存 2 h 后的受精率和孵化率分别为 66.4% 和 47.9% (图 1), 相比在未优化条件下, 分别提高了 22.2% 和 22.5% (见表 1)。尽管如此, 随着保存时间的延长, 卵子的活力仍急剧下降。在体外保存超过 4 h 后, 卵子的受精率和孵化率均显著降低。

### 3.3 血清在卵子保存中的作用

因血清含有许多细胞生长必需的营养物质, 被广泛用于细胞培养。为了延长鞍带石斑鱼卵子保存的时间, 我们尝试在 L-15 培养基中分别添加 FBS 和 GGS。结果表明, 添加 FBS 对鞍带石斑鱼卵子保存不利。在添加 FBS 培养基中, 我们观察到卵子内部含有分散的油球。油球被认为是海洋鱼类漂浮性卵子质量的重要指标<sup>[22-23]</sup>。在石斑鱼卵母细胞成熟过程中, 众多小油球逐渐融合成一个较大的油球<sup>[15-16, 24]</sup>。含有多油球的卵子其受精率显著下降和孵化率低<sup>[25]</sup>。在此, 因 FBS 添加而引起卵子内形成多油球现象的原因尚不清楚。

卵子在添加 GGS 的 L-15 培养基中保存 4 h 后, 受精率和孵化率都有了显著的提高。在梭鲈、露斯塔野鲮和小体鲟中, 利用卵巢液成功地建立了卵子短期保存系统<sup>[8, 11, 26]</sup>。这些研究表明, 鱼类体液适合维持卵子的活力, 有助于延长保存的时间。此外, 本研究还发现补充维生素预混料可有效地延长卵子的保存时间。在保存 8 h 后, 卵子的受精率仍保持在 60% 以上。研究表明, 维生素对亲鱼的繁殖性能和卵子质量起着关键作用<sup>[27]</sup>。在亲鱼培育中, 通常在饲料中补充维生素以促进卵子发育。然而, 维生素对体外卵子保存的作用尚不清楚。一些维生素具有抗氧化的功能, 在卵子保存过程中可能起到减少氧化反应的作用。

综上所述, 我们成功地建立了鞍带石斑鱼卵子体外短期保存的方法。保存温度为 22 °C 时, 在添加鞍带石斑鱼血清和维生素的 L-15 培养基 (pH=8.1) 中, 卵子可以在体外进行短期的保存 (约 8 h)。该保存系统有助于提升鞍带石斑鱼的人工繁育、孵化管理和杂交试验等生产实践的效率。

### 参考文献:

- [1] WILLIAMS K C. A review of feeding practices and nutritional requirements of postlarval groupers [J]. *Aquaculture*, 2009, 292(3): 141-152.
- [2] FAN B, LIU X C, MENG Z N, et al. Cryopreservation of giant grouper *Epinephelus lanceolatus* (Bloch, 1790) sperm [J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2014, 30(2): 334-339.
- [3] TIAN Y S, JIANG J, WANG N, et al. Sperm of the giant grouper: Cryopreservation, physiological and morphological analysis and application in hybridizations with red-spotted grouper [J]. *Journal of Reproduction and Development*, 2015, 61(4): 333-339.
- [4] CHEN Z F, TIAN Y S, WANG P F, et al. Embryonic and larval development of a hybrid between kelp grouper *Epinephelus moara* female × giant grouper *E. lanceolatus* male using cryopreserved sperm [J]. *Aquaculture Research*, 2018, 49(4): 1407-1413.
- [5] FAN B, YANG S, WANG L, et al. Hybridization of tiger grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀) × giant grouper (*Epinephelus lanceolatus* ♂) using cryopreserved sperm [J]. *Cryobiology*, 2020, 95: 84-89.
- [6] 张修建, 范弘毅. 金鱼精子和卵子简易保存试验 [J]. *河北渔业*, 2002, 125(5): 45-47+51.
- [7] ROTHBARD S, RUBINSHTAIN I, GELMAN E. Storage of common carp, *Cyprinus carpio* L., eggs for short durations [J]. *Aquaculture Research*, 1996, 27(3): 175-181.
- [8] LINHART O, SHELTON W L, TUČKOVÁ V, et al. Effects of temperature on in vitro short-term storage of sterlet sturgeon (*Acipenser ruthenus*) ova [J]. *Reproduction in Domestic Animals*, 2016, 51(1): 165-170.
- [9] GOETZ F W, COFFMAN M A, 张海琪. 虹鳟鱼未受精卵在人工配液中的保存方法 [J]. *江西水产科技*, 2000, 83(3): 41-46.
- [10] İNANAN B E. Fertilization rate, motility, lipid peroxidation and pH changes after chilled storage of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs and spermatozoa by a RMPI medium [J]. *Aquaculture Research*, 2019, 51(1): 222-231.
- [11] SAMARIN A M, SAMARIN A M, BLECHA M, et al. In vitro storage of pikeperch (*Sander lucioperca*) eggs [J]. *Aquaculture International*, 2019, 27(4): 1037-1044.
- [12] SELMAN K, PETRINO T R, WALLACE R A. Experimental conditions for oocyte maturation in the zebrafish, *Brachydanio rerio* [J]. *Journal of Experimental Zoology*, 1994, 269(6): 538-550.
- [13] PETRINO T R, TOUSSAINT G, LIN Y W P. Role of

- inhibin and activin in the modulation of gonadotropin- and steroid-induced oocyte maturation in the teleost *Fundulus heteroclitus* [J]. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2007, 5: 21.
- [14] NAIR S, LINDEMAN R E, PELEGRI F. *In vitro* oocyte culture-based manipulation of zebrafish maternal genes [J]. *Developmental Dynamics*, 2013, 242(1): 44-52.
- [15] TANG L, CHEN J X, YE Z S, et al. Transcriptomic analysis revealed the regulatory mechanisms of oocyte maturation and hydration in Orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) [J]. *Marine Biotechnology*, 2019, 21(4): 537-549.
- [16] TANG L, XIAO X X, SHI H R, et al. Induction of oocyte maturation and changes in the biochemical composition, physiology and molecular biology of oocytes during maturation and hydration in the orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) [J]. *Aquaculture*, 2020, 522: 735115.
- [17] RIZZO E, GODINHO H P, SATO Y. Short-term storage of oocytes from the neotropical teleost fish *Prochilodus marginatus* [J]. *Theriogenology*, 2003, 60(6): 1059-1070.
- [18] SANCHES E A, OKAWARA R Y, CANEPPELE D, et al. Storage of *Steindachneridion parahybae* oocytes at different temperatures [J]. *Animal Reproduction Science*, 2014, 151(3/4): 262-268.
- [19] SANCHES E A, NEUMANN G, BAGGIO D M, et al. Time and temperature on the storage of oocytes from jundia catfish, *Rhamdia quelen* [J]. *Aquaculture*, 2011, 319(3/4): 453-458.
- [20] HAJIREZAEI S, NIKSIRAT H. *In vitro* storage of ova of persian sturgeon, *Acipenser persicus* in ovarian fluid: The changes in the pH and osmolality of the ovarian fluid, fertilization and hatching rates [J]. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 2009, 3(4): 3438-3442.
- [21] KOMRAKOVA M, HOLTZ W. Factors responsible for successful chilled storage of unfertilized rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs [J]. *Aquaculture*, 2009, 286(3/4): 156-163.
- [22] LAHNSTEINER F, PATARNELLO P. The shape of the lipid vesicle is a potential marker for egg quality determination in the gilthead seabream, *Sparus aurata*, and in the sharpnose seabream, *Diplodus puntazzo* [J]. *Aquaculture*, 2005, 246(1/2/3/4): 423-435.
- [23] MANSOUR N, LAHNSTEINER F, PATZNER R A. Distribution of lipid droplets is an indicator for egg quality in brown trout, *Salmo trutta fario* [J]. *Aquaculture*, 2007, 273(4): 744-747.
- [24] SHEIN N L, CHUDA H, ARAKAWA T, et al. Ovarian development and final oocyte maturation in cultured sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus* [J]. *Fisheries Science*, 2004, 70(3): 360-365.
- [25] 林彬, 黄宗文, 骆剑等. 棕点石斑鱼胚胎发育的观察 [J]. *海南师范大学学报(自然科学版)*, 2010, 23(1): 87-92.
- [26] MISHRA G, PATRA S, DASH SK, et al. *In vitro* storage of fish oocytes: Effect of storage temperature, media conditions and storage duration on fertilization and larval hatchability of Indian major carp, rohu (*Labeo rohita*) [J]. *Aquaculture Research*, 2017, 48(5): 2486-2494.
- [27] LUBZENS E, YOUNG G, BOBE J, et al. Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 165(3): 367-389.

(责任编辑 张冰)