



近江牡蛎和长牡蛎的配子兼容性及其合子育性

李海昆¹, 于瑞海^{1*}, 刘洋¹, 李春华¹,
王永旺¹, 马培振^{1,2}, 李琪¹

(1. 中国海洋大学水产学院, 海水养殖教育部重点实验室, 山东青岛 266003;

2. 中国科学院海洋研究所, 山东青岛 266071)

摘要: 为了评估长牡蛎(GG)和近江牡蛎(AA)的配子兼容性和合子育性, 本实验探究了盐度(16、20、24、28和32)、温度(18、21、24、27和30 °C)和精子浓度(10^0 、 10^1 、 10^2 、 10^3 和 10^4 个/ μL)对受精率、胚胎畸形率和孵化率的影响。结果显示, 随盐度的增加, GG组的受精率和孵化率逐渐上升, 而AA组和AG组的受精率和孵化率先上升后下降; GA组和AG组分别在盐度28和24时具有较优的配子兼容性和合子育性, 受精率、畸形率、孵化率分别为 $7.45\% \pm 5.05\%$ 、 $2.00\% \pm 0.90\%$ 、 $63.60\% \pm 9.88\%$ 和 $14.26\% \pm 9.26\%$ 、 $1.74\% \pm 0.93\%$ 、 $66.16\% \pm 9.43\%$ 。随温度上升, AA、GA和GG组的受精率和孵化率先升高后下降, 而畸形率先下降后上升; GA组和AG组均在27 °C时表现出较优的配子兼容性和合子育性, 此时GA组和AG组的受精率、畸形率、孵化率分别为 $7.95\% \pm 4.04\%$ 、 $1.79\% \pm 1.04\%$ 、 $57.11\% \pm 9.95\%$ 和 $14.70\% \pm 7.27\%$ 、 $1.66\% \pm 0.85\%$ 、 $67.25\% \pm 15.19\%$ 。随精子浓度的增加, GG组的受精率逐渐上升, 孵化率逐渐下降, GA组和AG组的受精率逐渐上升; GA组和AG组均在 10^4 个/ μL 时表现出较优的配子兼容性和合子育性, 此时二者的受精率、畸形率、孵化率分别为 $9.09\% \pm 7.53\%$ 、 $1.59\% \pm 0.48\%$ 、 $67.97\% \pm 19.96\%$ 和 $14.30\% \pm 6.04\%$ 、 $1.06\% \pm 0.68\%$ 、 $67.33\% \pm 12.65\%$ 。研究表明, 温度、盐度和精子浓度对长牡蛎和近江牡蛎种间配子兼容性影响较小, 但对合子育性影响较大。

关键词: 近江牡蛎; 长牡蛎; 配子兼容性; 合子育性

中图分类号: Q 321; S 917.4

文献标志码: A

近江牡蛎(*Crassostrea ariakensis*)栖息于我国南北沿海盐度较低的河口区, 属于广温广盐性种类, 为我国重要的经济种, 年产量10万t左右^[1-4]。长牡蛎(*C. gigas*)又称太平洋牡蛎, 喜好高盐低温的环境, 具有生长快、产量高的特点, 是我国北方最为重要的经济牡蛎种类^[4-6]。种间杂交可以促进种间基因交流, 获得新的变异类型, 甚至可以获得有杂种优势的新品种^[7]。水产动物的种间杂交多数是为了加快生长速率、

提高产量、促进不同理想性状的结合(抗病性、耐受性以及肉质等)^[4,8]。对近江牡蛎和长牡蛎开展种间杂交, 以期获得具有经济性状杂种优势的牡蛎新品种, 而配子是否兼容是二者之间进行杂交首先要考虑的问题。

大多数牡蛎种间的生殖隔离都是配子不兼容导致的^[9], 这样的生殖隔离属于合子前生殖隔离^[10-11]。配子融合前隔离受精子结合素蛋白基因控制^[11-12], 同时与受精环境有关, 例如长牡蛎和

收稿日期: 2019-09-03 修回日期: 2020-04-04

资助项目: 国家自然科学基金(31172403); 山东省重点研发项目(2017GHY15124)

通信作者: 于瑞海, E-mail: yuruihai@ouc.edu.cn

岩牡蛎 (*C. nippona*) 的双向受精、葡萄牙牡蛎 (*C. angulata*) 和熊本牡蛎 (*C. sikamea*) 的单向受精, 其配子亲和力均受到环境因子的显著影响^[13-15], 而香港牡蛎 (*C. hongkongensis*) 和长牡蛎之间的单向受精却不受外界环境的影响^[16]。研究发现, 长牡蛎和近江牡蛎可以双向受精, 但受精率较低, 配子兼容性较差^[17-18], 但尚未见有学者报道环境因素是否会对二者的配子兼容性及其合子育性产生影响。本实验从温度、盐度、精子浓度 3 个方面探究受精和孵化环境对近江牡蛎和长牡蛎的配子兼容性以及合子发育的影响, 以期对近江牡蛎和长牡蛎种间杂交育种提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

近江牡蛎亲贝采自东营市垦利区黄河三角洲, 长牡蛎亲贝为二龄“海大 1 号”长牡蛎。两种牡蛎亲贝于 2019 年 6 月中旬在莱州市长渔水产有限公司育苗车间进行暂养: 暂养期间每天移池换水 1 次, 并投喂新月菱形藻 (*Nitzschia closterium*)。30 d 后, 近江牡蛎和“海大 1 号”长牡蛎性腺发育同步成熟, 可以进行授精实验。

1.2 实验设计

针对长牡蛎和近江牡蛎的生活习性, 共设计了 5 个盐度梯度 (16、20、24、28 和 32) 和 5 个温度梯度 (18、21、24、27 和 30 °C) 对两种牡蛎的配子兼容性及其合子育性进行探究, 每个盐度 (温度) 梯度下重复实验 6 次, 每次重复都是单一雌雄配对。盐度实验中, 以自然海水 (盐度 29) 和曝气 24 h 之后的淡水配制低盐度梯度, 用海盐和自然海水配制高盐度梯度, 实验温度 27 °C。温度实验中用冷水机和加热棒控制温度, 温差不超过 1 °C, 实验盐度 28。

精子浓度实验参照 Banks 等^[19] 和 Lyu 等^[20] 对配子兼容性分析的方法, 设计 5 个精子浓度梯度 (10^0 、 10^1 、 10^2 、 10^3 和 10^4 个/ μL), 分析精子浓度对二者配子兼容性的影响。精液经稀释后, 通过血球计数板确定精子浓度, 根据所需的精子浓度量取相应体积的精液, 获得不同精子浓度梯度, 每个浓度梯度重复实验 6 次, 实验温度 27 °C, 盐度 29。

实验中卵子密度控制在 30~40 个/mL, 受精

率为受精后 2 h 发生卵裂的卵子数目与总卵子数目的百分比, 畸形率为受精后 12 h 畸形胚胎与正常胚胎数目的百分比, 孵化率为受精后 48 h 获得的 D 形幼虫与受精卵数目的百分比。

1.3 数据分析

为了探讨杂交组盐度、温度、精子浓度与合子育性之间的关系, 参照苏家齐等^[15]、张跃环等^[16] 以及 Rawson 等^[21] 的方法对配子兼容性格局进行分析, 引入长牡蛎和近江牡蛎杂合子孵化率的 F_{50} 临界值 (杂交合子孵化率为 50% 时对应的盐度、温度、精子浓度值), 计算公式:

$$y = ax^2 + bx + c$$

式中, y 值表示孵化率 (%), x 表示盐度、温度 (°C) 或者精子浓度对数 (个/ μL), a 为二次项系数, b 为一次项系数, c 为常数。

所有数据均采用平均值 \pm 标准差 (mean \pm SD) 的方式表示。对不同的实验组之间进行单因素方差分析, 在进行方差分析之前检验方差齐性, 对不符合方差齐性的数据进行转化, 以保证方差齐性, 受精率和孵化率均转化为反正弦函数 Asin , 精子浓度转化为对数。用 SPSS 18.0 软件进行数据处理, 结合 Duncan 氏多重比较分析盐度、温度和精子浓度对配子兼容性和合子育性的影响, 显著性水平设为 0.05。

2 结果

2.1 盐度对配子受精率、胚胎畸形率及孵化率的影响

随盐度的升高, AA 组和 AG 组受精率先上升后下降, GG 组和 GA 组的受精率逐渐上升; AA 组和 GG 组分别在盐度 20 和 32 时出现最高受精率, 分别为 $86.44\% \pm 10.01\%$ 和 $90.49\% \pm 1.61\%$; AG 组和 GA 组分别在盐度 24 和 32 时出现最高受精率, 分别为 $14.26\% \pm 9.26\%$ 和 $7.45\% \pm 6.94\%$ (图 1-a)。随盐度的升高, AA 组与 AG 组的畸形率先下降后上升, GG 组和 GA 组的畸形率先上升后下降 (图 1-b)。随盐度的升高, AA、AG 和 GA 组孵化率先上升后下降, GG 组的孵化率逐渐上升; AA 组和 GG 组分别在盐度 28 时和盐度 32 时出现最高孵化率, 分别为 $89.69\% \pm 3.02\%$ 和 $91.64\% \pm 7.54\%$; AG 组和 GA 组均在盐度 28 时出现最高孵化率, 分别为 $72.65\% \pm 13.91\%$ 和 $63.60\% \pm$

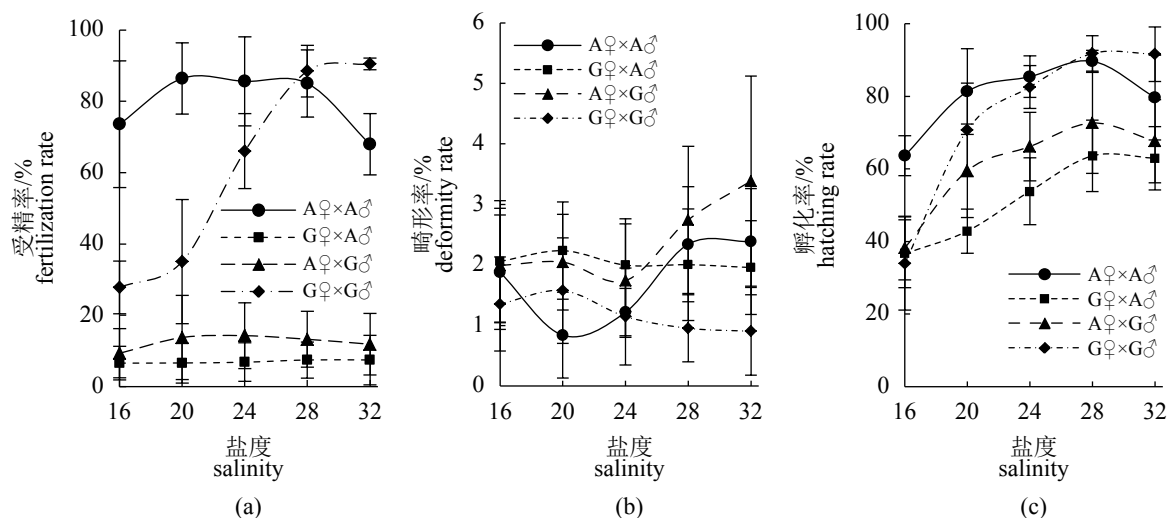


图 1 盐度对受精率、畸形率和孵化率的影响

图中的 $A♀ \times A♂$ 、 $G♀ \times A♂$ 、 $A♀ \times G♂$ 、 $G♀ \times G♂$ 分别表示近江牡蛎♀×近江牡蛎♂、长牡蛎♀×近江牡蛎♂、近江牡蛎♀×长牡蛎♂、长牡蛎♀×长牡蛎♂, 在文中分别用 AA、GA、AG 和 GG 表示。下同

Fig. 1 Effect of salinity on fertilization rate, deformity rate and hatching rate

$A♀ \times A♂$, $G♀ \times A♂$, $A♀ \times G♂$, $G♀ \times G♂$ in the figure represent *C. ariakensis*♀ × *C. ariakensis*♂, *C. gigas*♀ × *C. ariakensis*♂, *C. ariakensis*♀ × *C. gigas*♂, *C. gigas*♀ × *C. gigas*♂ respectively, represented by AA, GA, AG and GG respectively in the text. The same below

9.88% (图 1-c)。

方差分析的结果表明, 在 5 个盐度梯度下, 自交组的受精率都显著高于杂交组 ($P > 0.05$), 当盐度高于 24 时, GG 组受精率高于 AA 组, 盐度低于 24 时 AA 组受精率更高; AG 组的受精率一直高于 GA 组, 但差异不显著 ($P < 0.05$)。畸形率方面, 除盐度 28 和 32 之外, 其他各盐度梯度杂交组畸形率均大于自交组畸形率, 但差异不显著 ($P > 0.05$)。在盐度 16 的条件下, AA 组的孵化率最高, 显著高于其他 3 组 ($P > 0.05$), 长牡蛎自交组最低。在盐度 > 24 的条件下, GG 组的孵化率最高, 显著高于杂交组 ($P > 0.05$), 但与 AA 组相比差异不显著 ($P < 0.05$) (表 1)。

2.2 温度对配子受精率、胚胎畸形率及孵化率的影响

不同的温度下, 自交组的受精率变化幅度较大, 而杂交组的受精率变化较小; 随温度的升高, AA、AG、GA 和 GG 组的受精率先上升后下降, 均在 27 °C 时出现最高受精率, 分别为 $89.47\% \pm 9.14\%$ 、 $14.70\% \pm 7.27\%$ 、 $7.95\% \pm 4.04\%$ 和 $92.27\% \pm 3.12\%$ (图 2-a)。随温度的升高, AA、AG、GA 和 GG 组的畸形率先下降后上升, 均在 24 °C 时出现最低畸形率 (图 2-b)。随温度的升高, AG 组的孵化率逐渐上升, AA、GG 和 GA 组的孵化

率先上升后下降; AA 和 GG 组均在 27 °C 时出现最高孵化率, 分别为 $90.50\% \pm 11.18\%$ 和 $90.04\% \pm 9.95\%$; GA 和 AG 组分别在 24 和 30 °C 时出现最高孵化率, 分别为 $62.23\% \pm 2.38\%$ 和 $67.59\% \pm 15.19\%$ (图 2-c)。

方差分析的结果表明, 在各个温度下, 自交组的受精率均显著大于杂交组 ($P > 0.05$)。AG 组受精率大于 GA 组, 但差异不显著 ($P < 0.05$); 自交组内, 除 18 °C 以外, 其他各个温度下 GG 组的受精率均大于 AA 组。除了温度 30 °C 以外, 其他温度下各组的畸形率均无显著性差异 ($P < 0.05$)。自交组的孵化率均高于杂交组。除 30 °C 以外, 自交组内在各个温度下孵化率均无显著性差异 ($P < 0.05$), 温度小于 27 °C 时, GG 自交组的孵化率大于 AA 组的孵化率, 温度大于 24 °C, AA 组的孵化率大于 GG 组 (表 2)。

2.3 精子浓度对配子受精率、胚胎畸形率和孵化率的影响

随精子浓度的升高, AG、GA 和 GG 组的受精率逐渐上升, AA 组的受精率先上升后下降; AG、GA 和 GG 组均在 10^4 个/ μL 时出现最高受精率, 分别为 $14.30\% \pm 6.04\%$ 、 $9.09\% \pm 7.53\%$ 和 $93.94\% \pm 5.33\%$; AA 组在 10^3 个/ μL 时受精率最高, 达 $89.05\% \pm 3.69\%$ (图 3-a)。精子浓度对 AA、GG 组

表 1 盐度对受精率、胚胎畸形率、孵化率影响的方差分析

指标 index	盐度 salinity	df	Ms	P	多重比较 multiple comparison
受精率 fertilization rate	16	3	0.557	0.000 **	AA ^a >GG ^b >AG ^c >GA ^c
	20	3	0.775	0.000 **	AA ^a >GG ^b >AG ^c >GA ^c
	24	3	0.964	0.000 **	AA ^a >GG ^b >AG ^c >GA ^b
	28	3	1.215	0.000 **	GG ^a >AA ^b >AG ^b >GA ^b
	32	3	1.019	0.000 **	GG ^a >AA ^b >AG ^c >GA ^c
畸形率 deformity rate	16	3	0.000	0.550	GA ^a >AG ^a >AA ^a >GG ^a
	20	3	0.000	0.030*	GA ^a >AG ^a >AA ^{ab} >GG ^b
	24	3	0.000	0.184	GA ^a >AG ^a >AA ^a >GG ^a
	28	3	0.000	0.022*	AG ^a >AA ^a >GA ^{ab} >GG ^b
	32	3	0.000	0.008 **	AG ^a >AA ^{ab} >GA ^{bc} >GG ^c
孵化率 hatching rate	16	3	0.115	0.000 **	AA ^a >AG ^b >GA ^b >GG ^b
	20	3	0.163	0.000 **	AA ^a >GG ^{ab} >AG ^b >GA ^c
	24	3	0.896	0.000 **	AA ^a >GG ^a >AG ^b >GA ^c
	28	3	0.111	0.000 **	GG ^a >AA ^b >AG ^b >GA ^b
	32	3	0.099	0.000 **	GG ^a >AA ^b >AG ^b >GA ^b

注: *表示差异显著($P < 0.05$), **表示差异极显著($P < 0.01$); 多重比较中上标字母不同表示差异显著($P < 0.05$), 下同

Notes: * means difference ($P < 0.05$), ** means significant difference ($P < 0.01$); different superscripts indicate significant difference ($P < 0.05$), the same below

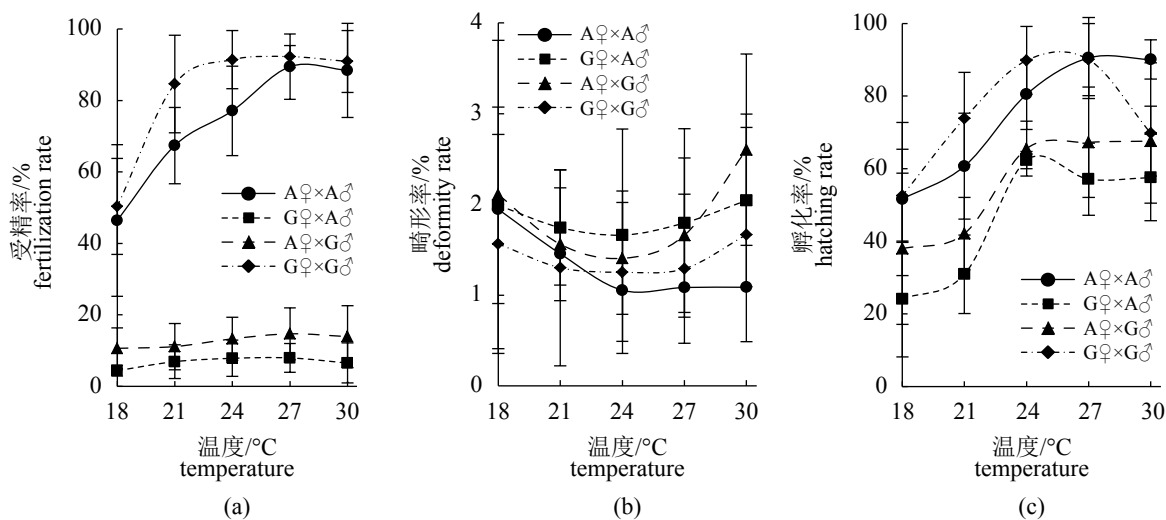


图 2 温度对受精率、畸形率和孵化率的影响

Fig. 2 Effect of temperature on fertilization rate, deformity rate and hatching rate

的胚胎畸形率影响较大, 精子浓度超过 10^2 个/ μL 时, 畸形率明显增大; AG、GA 组的胚胎畸形率在各个精子浓度条件下变化幅度较小 (图 3-b)。随精子浓度的升高, AA 和 GG 组的孵化率在精

子浓度为 $10^0 \sim 10^2$ 个/ μL 时的变化幅度较小, 但精子浓度超过 10^2 个/ μL 时, 孵化率明显下降; 精子浓度为 10^1 个/ μL 时, AA 和 GG 组的孵化率最高分别为 $86.83\% \pm 3.55\%$ 和 $88.47\% \pm 6.35\%$; 随精

表 2 温度对受精率、胚胎畸形率和孵化率影响的方差分析

Tab. 2 Variance analysis of effect of temperature on fertilization rate, deformity rate and hatching rate

指标 index	温度/°C temperature	df	Ms	P	多重比较 multiple comparison
受精率 fertilization rate	18	3	0.289	0.000**	AA ^a >GG ^a >AG ^b >GA ^b
	21	3	0.793	0.000**	GG ^a >AA ^b >AG ^b >GA ^c
	24	3	1.110	0.000**	GG ^a >AA ^b >AG ^b >GA ^c
	27	3	0.799	0.000**	GG ^a >AA ^b >AG ^b >GA ^b
	30	3	1.284	0.000**	GG ^a >AA ^b >AG ^b >GA ^b
畸形率 deformity rate	18	3	0.000	0.918	AG ^a >GA ^a >AA ^b >GG ^a
	21	3	0.000	0.797	GA ^a >AG ^a >AA ^b >GG ^a
	24	3	0.000	0.655	GA ^a >AG ^a >GG ^a >AA ^a
	27	3	0.000	0.469	GA ^a >AG ^a >GG ^a >AA ^a
	30	3	0.000	0.100	AG ^a >GA ^{ab} >GG ^{ab} >AA ^b
孵化率 hatching rate	18	3	0.006	0.040*	GG ^a >AA ^a >AG ^{ab} >GA ^b
	21	3	0.249	0.000**	GG ^a >AA ^a >AG ^b >GA ^b
	24	3	0.059	0.026*	GG ^a >AA ^{ab} >AG ^b >GA ^b
	27	3	0.160	0.000**	AA ^a >GG ^a >AG ^b >GA ^b
	30	3	0.111	0.002**	AA ^a >GG ^b >AG ^b >GA ^b

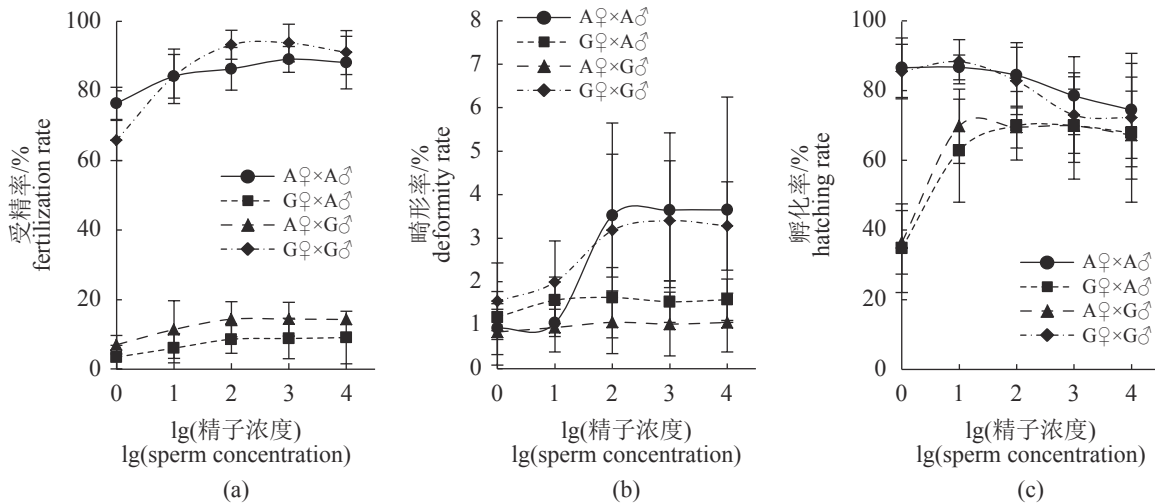


图 3 精子浓度对受精率、畸形率和孵化率的影响

Fig. 3 Effect of sperm concentration on fertilization rate, deformity rate and hatching rate

子浓度的升高, AG 和 GA 组的孵化率先上升后下降, 但精子浓度超过 10² 个/μL 时, 孵化率几乎不变, AG 和 GA 组均在精子浓度为 10³ 个/μL 时出现最高孵化率, 分别为 69.99%±15.30% 和 70.07%±10.54%(图 3-c)。

方差分析的结果表明, 在各个精子浓度中, 自交组的受精率均显著大于杂交组的受精率

($P>0.05$)。精子浓度为 10⁰ 个/μL 时, AA 组的受精率显著大于 GG 组的受精率 ($P>0.05$), 在其他条件下, GG 组的受精率均小于 AA 组的受精率; AG 组的受精率一直大于 GA 组的受精率, 但差异不显著 ($P<0.05$)。精子浓度为 10⁰ 个/μL 时, 各组畸形率无显著性差异 ($P<0.05$), 精子浓度超过 10² 个/μL 时, 自交组的畸形率均高于杂交组。

10^4 个/ μL 时, 4 组的孵化率差异不显著 ($P < 0.05$), 在其他条件下, 自交组的孵化率均显著大于杂交组的孵化率 ($P > 0.05$); 杂交组内, AG 组的孵化率始终大于 GA 组, 但差异不显著 ($P < 0.05$) (表 3)。

对杂交组的孵化率做了 F_{50} 值的计算 (表 4), 结果表明, 盐度、温度和精子浓度实验中 F_{50} 临界值均为 $\text{GA} > \text{AG}$ 。温度是影响 GG 组受精和孵化的主要因子, 盐度是次要因子; 而盐度是影响 AA 组受精和孵化的主要因子, 温度是次要因子。在杂交组内, 温度和盐度对其受精率的影响不显著, 盐度是影响 AG 和 GA 组孵化率的主

要因子, 其次是温度 (表 5)。

3 讨论

3.1 配子兼容性分析

近江牡蛎 (AA) 和长牡蛎 (GG) 可以双向受精, 但是其受精强度受到温度、盐度和精子浓度的影响。AA 在相对低盐 (16~28) 条件下的配子亲和力明显优于其他 3 组, 表现出对低盐的耐受性。对于近江牡蛎而言, 浮游幼虫变态之前的各生长期偏好低盐环境^[22-23], 本实验中近江牡

表 3 精子浓度对受精率、胚胎畸形率和孵化率影响的方差分析

Tab. 3 Variance analysis of effect of sperm concentration on fertilization rate, deformity rate and hatching rate

指标 index	精子浓度/(个/ μL) sperm concentration	df	Ms	P	多重比较 multiple comparison
受精率 fertilization rate	10^0	3	0.880	0.000**	AA ^a >GG ^b >AG ^c >GA ^c
	10^1	3	1.142	0.000**	GG ^a >AA ^b >AG ^b >GA ^b
	10^2	3	1.235	0.000**	GG ^a >AA ^b >AG ^c >GA ^c
	10^3	3	1.488	0.000**	GG ^a >AA ^b >AG ^b >GA ^b
	10^4	3	1.216	0.000**	GG ^a >AA ^b >AG ^b >GA ^b
畸形率 deformity rate	10^0	3	0.000	0.303	GG ^a >GA ^b >AA ^a >AG ^a
	10^1	3	0.000	0.034*	GG ^a >GA ^b >AA ^b >AG ^b
	10^2	3	0.000	0.028*	AA ^a >GG ^a >GA ^{ab} >AG ^b
	10^3	3	0.001	0.002*	AA ^a >GG ^a >GA ^b >AG ^b
	10^4	3	0.001	0.014*	AA ^a >GG ^{ab} >GA ^{bc} >AG ^c
孵化率 hatching rate	10^0	3	0.117	0.000**	AA ^a >GG ^a >AG ^b >GA ^b
	10^1	3	0.101	0.000**	GG ^a >AA ^b >AG ^b >GA ^b
	10^2	3	0.039	0.010*	AA ^a >GG ^a >AG ^b >GA ^b
	10^3	3	0.010	0.575	AA ^a >GG ^a >AG ^b >GA ^a
	10^4	3	0.077	0.822	AA ^a >GG ^a >AG ^b >GA ^a

表 4 杂交组在不同的盐度、温度和精子浓度时胚胎孵化率的 F_{50} 值

Tab. 4 F_{50} value of embryo hatching rate at different salinity, temperature and sperm concentration

因子 index	来源 source	F_{50}	公式 formula	x	R^2
盐度 salinity	GA	21.91	$y = -0.066 7x^2 + 5.038 2x - 28.371 1$	16~32	0.960 0
	AG	18.20	$y = -0.235 7x^2 + 13.113 2x - 110.600 0$	16~32	0.985 6
温度/ $^{\circ}\text{C}$ temperature	GA	23.01	$y = -0.392 1x^2 + 21.920 0x - 246.779 9$	18~30	0.846 5
	AG	21.06	$y = -0.232 6x^2 + 13.976 1x - 141.190 0$	18~30	0.889 6
精子浓度/(个/ μL) sperm concentration	GA	3.54	$y = -4.810 0x^2 + 26.601 3x + 36.846 4$	0~4	0.959 6
	AG	2.53	$y = -5.110 0x^2 + 26.619 4x + 40.091 7$	0~4	0.866 8

表 5 温度、盐度及二者的交互作用对受精率、孵化率的影响

Tab. 5 Effect of temperature, salinity and their interaction on fertilization rate and hatching rate

指标 index	类别 item	来源 source	df	Ms	P
受精率 fertilization rate	AA	T	4	0.189	0.000 **
		S	4	0.043	0.094
		T×S	1	0.052	0.226
	GA	T	4	0.001	0.642
		S	4	0.000	0.999
		T×S	1	0.000	0.939
	AG	T	4	0.002	0.810
		S	4	0.002	0.882
		T×S	1	0.001	0.573
	GG	T	4	0.191	0.000 **
		S	4	0.544	0.000 **
		T×S	1	0.500	0.007*
孵化率 hatching rate	AA	T	4	0.196	0.000 **
		S	4	0.066	0.000 **
		T×S	1	0.032	0.297
	GA	T	4	0.184	0.000 **
		S	4	0.087	0.000 **
		T×S	1	0.046	0.222
	AG	T	4	0.362	0.000 **
		S	4	0.109	0.000 **
		T×S	1	2.101	0.000 **
	GG	T	4	0.162	0.000 **
		S	4	0.348	0.000 **
		T×S	1	0.500	0.007*

蛎在低盐环境中也表现出较优的配子亲和力。随盐度变化, AG 和 GA 组的受精率变化幅度较小, 但其受精率的变化趋势与各自母本受精率的变化趋势具有一定的同步性, 说明配子兼容性对盐度的响应具有一定的母本效应。温度对 4 组受精率的影响基本相同, 在 18~27 °C 时, 随温度升高, 受精率逐渐增加。在岩牡蛎和长牡蛎^[13]、香港牡蛎和长牡蛎配子兼容性^[16]、熊本牡蛎和葡萄牙牡蛎^[17] 的研究中均发现, 适当升高温度会提高受精率。适当增加精子浓度会提高受精率,

这种效应在杂交组中更为明显, GA 和 AG 组均在 10⁴ 个/μL 时受精率最高, 以往的牡蛎杂交育种研究也表明, 适当增加精子浓度可以提高配子亲和力^[13,16-17,24-25]。

3.2 合子育性分析

在双壳贝类中, 能够受精但不能孵化至 D 形幼虫的现象称为合子不育^[26-27], 本研究中 4 组合子均能够发育至 D 形幼虫。AA 和 GG 组的畸形率与孵化率均呈现负相关关系, 推测原因可能是极端的盐度环境使得胚胎不能正常发育, 胚胎畸形率上升、孵化率下降^[15]。AA 组在胚胎发育过程中盐度适应能力仍然优于其他几组, 且在低盐环境中其合子育性最优。盐度超过 24 时, AG 组的胚胎畸形率明显升高, 孵化率有下降的趋势, 因此 AG 组不适合在高盐的环境中孵化。从 F₅₀ 临界值可以看出, AG 比 GA 组更能适应低盐的环境, 与其母本 (AA) 相似, 这说明杂种后代的胚胎发育在盐度适应性上表现出母本效应。

AA 组的孵化率随温度升高逐渐上升, GG 组的孵化率在高温时较低, 说明近江牡蛎的胚胎发育过程更能耐受高温环境, 这可能与近江牡蛎的生活环境有关, 黄河三角洲河口区在牡蛎的繁殖季节温度不稳定^[28], 此过程中近江牡蛎性腺发育积温不够, 相比于生活在正常海水中的牡蛎, 其性腺发育缓慢, 精卵排放较晚, 精卵能够适应夏季高温环境。杂交组中, GA 和 AG 组在温度 24 °C 以下时孵化率较低, 温度 24~30 °C 孵化率较高。

精子浓度实验中, 自交组内精子浓度较高时, 其胚胎的畸形率增大, 孵化率降低。过多的精子攻击卵母细胞, 质量差的卵母细胞畸形破裂, 过多的精液和破裂的卵子导致水质恶化, 合子孵化率降低。此外, 精子浓度过高时可能导致多精入卵, 孵化率下降^[29-31]。杂交组内, 精子浓度为 10¹~10⁴ 个/μL 时, 胚胎的畸形率以及胚胎的孵化率随精子浓度的增加变化不显著, 配子结合蛋白导致二者之间配子的结合率低, 而精子浓度的提高只会使得原本能够结合的精卵碰撞的几率增加, 小幅度地提高受精率, 但对后续的胚胎发育过程不会有太大的影响^[32]。所以对于杂交组来说, 适当地提高精子浓度可以增加 D 形幼虫的产量^[13-14,16-17]。

本研究发现, 盐度、温度和精子浓度对近江牡蛎和长牡蛎种内配子的兼容性有显著影响, 对种内和种间的合子育性也有显著影响, 但是对种间的配子兼容性影响较小。相较于长牡蛎, 近江牡蛎的配子识别和胚胎发育过程更能适应低盐、高温的环境。温度 27 °C、盐度 24(AG) 或 28(GA)、精子浓度 10⁴ 个/μL 时为近江牡蛎和长牡蛎的最佳杂交条件。

参考文献 (References):

- [1] Wang H Y, Guo X M, Zhang G F, *et al.* Classification of Jinjiang oysters *Crassostrea rivularis* (Gould, 1861) from China, based on morphology and phylogenetic analysis[J]. *Aquaculture*, 2004, 242(1-4): 137-155.
- [2] Wang H Y, Qian L M, Zhang G F, *et al.* Distribution of *Crassostrea ariakensis* in China[J]. *Journal of Shellfish Research*, 2006, 25: 789-790.
- [3] 霍忠明, 王昭萍, 梁健, 等. 香港巨牡蛎与近江牡蛎杂交及回交子代早期生长发育比较[J]. *水产学报*, 2013, 37(8): 1155-1161.
Huo Z M, Wang Z P, Liang J, *et al.* Comparisons of growth and development of hybrid and backcrossing progenies between *Crassostrea hongkongensis* and *Crassostrea ariakensis*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(8): 1155-1161(in Chinese).
- [4] 张跃环, 王昭萍, 喻子牛, 等. 养殖牡蛎种间杂交的研究概况与最新进展[J]. *水产学报*, 2014, 38(4): 624-636.
Zhang Y H, Wang Z P, Yu Z N, *et al.* A recent review of interspecific hybridization among cultivated oysters[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(4): 624-636(in Chinese).
- [5] 张景晓, 李琪, 徐成勋. 长牡蛎‘海大1号’生长性状的遗传参数评估[J]. *中国水产科学*, 2018, 25(5): 998-1003.
Zhang J X, Li Q, Xu C X. Estimates of genetic parameters of growth-related traits in *Crassostrea gigas* ‘Haida No.1’[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2018, 25(5): 998-1003(in Chinese).
- [6] 张跃环, 王昭萍, 闫喜武, 等. 香港巨牡蛎和长牡蛎幼虫及稚贝的表型性状[J]. *生态学报*, 2012, 32(4): 1105-1114.
Zhang Y H, Wang Z P, Yan X W, *et al.* Phenotypic traits of both larvae and juvenile *Crassostrea hongkongensis* and *C. gigas*[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2012, 32(4): 1105-1114(in Chinese).
- [7] 楼允东. 鱼类育种学[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 83-84.
Lou Y D. *Fish Breeding*[M]. Beijing: Science Press, 1998: 83-84(in Chinese).
- [8] Rahman M A, Arshad A, Marimuthu K, *et al.* Inter-specific hybridization and its potential for aquaculture of fin fishes[J]. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 2013, 8(2): 139-153.
- [9] Palumbi S R. Marine speciation on a small planet[J]. *Trends in Ecology & Evolution*, 1992, 7(4): 114-118.
- [10] Palumbi S R, Metz E C. Strong reproductive isolation between closely related tropical sea urchins (genus *Echinometra*)[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1991, 8(2): 227-239.
- [11] Palumbi S R. Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation[J]. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 1994, 25(1): 547-572.
- [12] Springer S A, Moy G W, Friend D S, *et al.* Oyster sperm bindin is a combinatorial fucose lectin with remarkable intra-species diversity[J]. *The International Journal of Developmental Biology*, 2008, 52(5-6): 759-768.
- [13] 徐洪强, 李琪, 张景晓. 长牡蛎和岩牡蛎种间配子兼容性及其合子育性分析[J]. *中国海洋大学学报*, 2018, 48(12): 15-22.
Xu H Q, Li Q, Zhang J X. Analysis of gamete compatibility and zygote fertility for *Crassostrea gigas* and *Crassostrea nippona*[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2018, 48(12): 15-22(in Chinese).
- [14] Xu H Q, Li Q, Han Z Q, *et al.* Fertilization, survival and growth of reciprocal crosses between two oysters, *Crassostrea gigas* and *Crassostrea nippona*[J]. *Aquaculture*, 2019, 507: 91-96.
- [15] 苏家齐, 王昭萍, 张跃环, 等. 葡萄牙牡蛎与熊本牡蛎种间配子亲和力及合子育性分析[J]. *水产学报*, 2015, 39(3): 353-360.
Su J Q, Wang Z P, Zhang Y H, *et al.* Analysis of gamete compatibility and zygote fertility for *Crassostrea angulata* and *Crassostrea sikamea*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(3): 353-360(in Chinese).
- [16] 张跃环, 王昭萍, 闫喜武, 等. 香港巨牡蛎与长牡蛎种间配子兼容性[J]. *生态学报*, 2013, 33(10): 3047-3055.
Zhang Y H, Wang Z P, Yan X W, *et al.* Analysis of 中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- gamete compatibility between *Crassostrea hongkongensis* and *C. gigas*[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2013, 33(10): 3047-3055(in Chinese).
- [17] 张跃环, 王昭萍, 闫喜武, 等. 太平洋牡蛎与近江牡蛎的种间杂交[J]. *水产学报*, 2012, 36(8): 1215-1224.
Zhang Y H, Wang Z P, Yan X W, *et al.* Interspecific hybridization between two oysters *Crassostrea gigas* and *C. ariakensis*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(8): 1215-1224(in Chinese).
- [18] 姚托. 长牡蛎、葡萄牙牡蛎与近江牡蛎的种间杂交研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.
Yao T. Hybridization between *Crassostrea ariakensis* and *C. gigas*, *C. angulata*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014(in Chinese).
- [19] Banks M A, McGoldrick D J, Borgeson W, *et al.* Gametic incompatibility and genetic divergence of Pacific and Kumamoto oysters, *Crassostrea gigas* and *C. sikamea*[J]. *Marine Biology*, 1994, 121(1): 127-135.
- [20] Lyu S, Allen S K J. Effect of sperm density on hybridization between *Crassostrea virginica*, Gmelin and *C. gigas* (Thunberg)[J]. *Journal of Shellfish Research*, 1999, 18(2): 459-464.
- [21] Rawson P D, Slaughter C, Yund P O. Patterns of gamete incompatibility between the blue mussels *Mytilus edulis* and *M. trossulus*[J]. *Marine Biology*, 2003, 143(2): 317-325.
- [22] Calvo G W, Luckenbach M W, Allen S K Jr, *et al.* A comparative field study of *Crassostrea ariakensis* (Fujita 1913) and *Crassostrea virginica* (Gmelin 1791) in relation to salinity in Virginia[J]. *Journal of Shellfish Research*, 2001, 20(1): 221-229.
- [23] Guo X M, Ford S E, Zhang F S. Molluscan aquaculture in China[J]. *Journal of Shellfish Research*, 1999, 18(1): 19-31.
- [24] Xu F, Zhang G F, Liu X, *et al.* Laboratory hybridization between *Crassostrea ariakensis* and *C. sikamea*[J]. *Journal of Shellfish Research*, 2009, 28(3): 453-458.
- [25] Kregting L T, Thomas F I M, Bass A L, *et al.* Relative effects of gamete compatibility and hydrodynamics on fertilization in the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*[J]. *The Biological Bulletin*, 2014, 227(1): 33-39.
- [26] 张跃环. 香港巨牡蛎 *Crassostrea hongkongensis* 与长牡蛎 *C. gigas* 种间杂交效应及遗传改良研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.
Zhang Y H. Interspecific hybridization effect and genetic improvement between two cupped oyster, *Crassostrea hongkongensis* and *C. gigas*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2012(in Chinese).
- [27] Gaffney P M, Allen S K J. Hybridization among *Crassostrea* species: a review[J]. *Aquaculture*, 1993, 116(1): 1-13.
- [28] 纪大伟. 黄河口及邻近海域生态环境状况与影响因素研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2006.
Ji D W. Study on the Yellow River Estuary environment status and its influencing factors[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2006(in Chinese).
- [29] Stephano J L, Gould M. Avoiding polyspermy in oyster (*Crassostrea gigas*)[J]. *Aquaculture*, 1988, 73(1-4): 295-307.
- [30] Togo T, Morisawa M. Mechanisms for blocking polyspermy in oocytes of the oyster *Crassostrea gigas*[J]. *Journal of Experimental Zoology*, 1999, 283(3): 307-314.
- [31] Misamore M, Silverman H, Lynn J W. Analysis of fertilization and polyspermy in serotonin-spawned eggs of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*[J]. *Molecular Reproduction and Development*, 1996, 43(2): 205-216.
- [32] Moy G W, Springer S A, Adams S L, *et al.* Extraordinary intraspecific diversity in oyster sperm binding[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(6): 1993-1998.

Analysis of gamete compatibility and zygote fertility between *Crassostrea ariakensis* and *Crassostrea gigas*

LI Haikun¹, YU Ruihai^{1*}, LIU Yang¹, LI Chunhua¹,
WANG Yongwang¹, MA Peizhen^{1,2}, LI Qi¹

(1. Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Fisheries College, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Science, Qingdao 266071, China)

Abstract: This study evaluated the gametic compatibility and zygotic fertility of *Crassostrea ariakensis* and *C. gigas*. The fertilization rate, deformity rate and hatching rate at different temperatures (18, 21, 24, 27, and 30 °C), different salinities (16, 20, 24, 28, and 32) and different sperm concentrations (10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 and 10^4 ind./ μ L) were compared. The results showed that symmetric fertilization was possible between *C. gigas* and *C. ariakensis*, and the zygote could successfully hatch. With the increase of salinity, the fertilization rate and hatching rate of GG rose, while that of AA and AG rose first and then decreased. GA and AG had better gamete compatibility and zygotic fertility at salinity 28 and 24, in this case, the fertilization rate, deformity rate and hatching rate were $7.45\% \pm 5.05\%$, $2.00\% \pm 0.90\%$, $63.60\% \pm 9.88\%$ and $14.26\% \pm 9.26\%$, $1.74\% \pm 0.93\%$, $66.16\% \pm 9.43\%$, respectively. With the increase of temperature, the fertilization rate and hatching rate of AA, GA and GG rose first and then decreased. The fertilization rate, deformity rate and incubation rate of GA and AG at temperature of 27 °C were severally $7.95\% \pm 4.04\%$, $1.79\% \pm 1.04\%$, $57.11\% \pm 9.95\%$ and $14.70\% \pm 7.27\%$, $1.66\% \pm 0.85\%$, $67.25\% \pm 15.19\%$. With the increase of sperm concentration, the fertilization rate of GG gradually rose and the hatching rate mainly decreased, while the fertilization rate of GA and AG groups gradually increased. The fertilization rate, deformity rate and hatching rate of GA and AG at sperm concentration of 10^4 ind./ μ L were severally $9.09\% \pm 7.53\%$, $1.59\% \pm 0.48\%$, $67.97\% \pm 19.96\%$ and $14.30\% \pm 6.04\%$, $1.06\% \pm 0.68\%$, $67.33\% \pm 12.65\%$. This study indicate that temperature, salinity and sperm concentration had minor effect on gamete compatibility between *C. gigas* and *C. ariakensis*, but had conspicuous effect on zygotic fertility.

Key words: *Crassostrea ariakensis*; *Crassostrea gigas*; gametic compatibility; zygotic fertility

Corresponding author: YU Ruihai. E-mail: yuruihai@ouc.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31172403); Key Research and Development Project of Shandong Province (2017GHY15124)