

杂色鲍与盘鲍种间杂交受精率的影响因素

蔡明夷^{1,2}, 柯才焕¹, 王桂忠¹, 王志勇², 王艺磊²

(1. 厦门大学 海洋系, 海洋环境科学教育部重点实验室, 福建 厦门 361005; 2. 集美大学 水产生物技术研究所, 福建 厦门 361021)

摘要: 研究卵子排放后的时间、精子排放后的时间、授精精子浓度、胰蛋白酶、钙离子、pH 和水温等因子对杂色鲍(*Haliotis diversicolor*, 以下简称 S)与盘鲍(*H. discus discus*, 以下简称 J)种间杂交受精率的影响。结果表明, 卵子排放后的时间和授精精子浓度是影响杂交受精率两个最重要的因素。与自繁组合相比, 正反杂交受精率均较低且下降速度快得多。水温 21.5℃ 时, 两亲本自繁对照组中, 卵子排放 1 h 对受精率均无显著影响。而 SJ 杂交, 卵子排放时间 2 min 时, 受精率为 55.9% ± 8.1%, 4.7 min 时受精率已下降了 50%; JS 杂交, 卵子排放时间为 4 min 时, 受精率为 31.5% ± 9.7%, 10 min 时受精率下降至 4 min 时的 29.1%。相比之下, 精子排放时间对杂交受精率的影响小得多, 3 h 内对正反杂交受精率没有显著影响。杂交适宜精子浓度约为母本自繁的 100 倍, 其中 SJ 杂交适宜授精精子浓度为 $6.0 \times 10^6 \sim 2.4 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$, JS 杂交适宜授精精子浓度为 $3.8 \times 10^7 \sim 7.5 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ 。水温对于杂交受精率也有影响, 短时间内将水温控制在 26~29℃ 可以得到较高受精率。其他实验因素, 如添加胰蛋白酶、 Ca^{2+} 或改变授精体系 pH 对杂交受精率均无正向作用。[中国水产科学, 2006, 13(2): 230~236]

关键词: 杂色鲍; 盘鲍; 种间杂交; 受精率

中图分类号: S917.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2006)02-0230-07

鲍(abalone)经济价值极高, 素有软黄金的美称。20 世纪 60 年代日本人最早开始研究鲍的增养殖技术, 80 年代起, 鲍鱼养殖业在中国迅速发展起来。为了支持鲍养殖业的可持续发展, 世界各国纷纷开展了鲍的遗传育种研究, 杂交育种是其中最重要的研究内容之一。种间杂交在水产生物育种和种质创新中有广泛用途, 如引入其他物种的优良基因, 创造新的物种, 诱导雌核发育, 生产不育群体等^[1]。Leighton 等^[2]最早报道了鲍的种间杂交实验, 研究了红鲍(*Haliotis refuscence*)、绿鲍(*H. fulgens*)、粉红鲍(*H. corrugata*)、白鲍(*H. sorenseni*)等 4 种鲍之间 10 个组合的杂交受精率及存活杂交后代的成活率和生长速度。20 世纪 90 年代, 中国学者相继开展了盘鲍(*H. discus discus*)^[3]、红鲍^[4]、日本虾夷盘鲍(*H. gigantea discus*)^[5]等种类的引种及其与当地种类的种间杂交研究。一些种间杂交在子一代就表现出杂种优势, 如成活率、生长速度^[2]及抗病力^[4]优势, 但杂交受精率通常低于自繁组合, 特

别是亲缘关系较远的杂交组合。受精率低是进一步研究和利用远缘杂交的主要障碍。如何克服远缘杂交不亲和是植物种间杂交的重要研究内容, 但这方面的研究在水产生物中相对较少。

本研究所用杂色鲍(*H. diversicolor*)和盘鲍是中国最重要两种养殖鲍, 原产地分别为中国的台湾和日本。杂色鲍和盘鲍的适温范围和生长性存在互补性, 因此通过这两种鲍杂交结合选育就可能得到综合双亲性状的优良品种。柯才焕等^[6]研究表明, 杂色鲍和盘鲍种间杂交是可能的, 但是不同批次之间受精率的波动较大, 如杂色鲍(♀)×盘鲍(♂)杂交受精率最低仅为 5.3%, 最高可达 53.6%。目前, 对于杂色鲍与盘鲍种间杂交受精率在不同批次间大幅度波动的原因尚不明了。杂交受精率低, 这不仅极大地影响了育种工作效率, 同时使杂交受精生物学等基础研究难以开展。本课题研究了卵子排放后的时间、精子排放后的时间、授精精子浓度、pH、温度、 Ca^{2+} 和胰蛋白酶等因素对杂色鲍与盘鲍

收稿日期: 2005-05-27; 修订日期: 2005-08-23.

基金项目: 国家“863”计划课题资助(2003AA603240).

作者简介: 蔡明夷(1973-)女, 厦门大学海洋系博士生, 主要从事海洋生物技术研究. E-mail: mycai@xmu.edu.cn

通讯作者: 柯才焕. Tel: 0592-2187420. E-mail: chke@xmu.edu.cn

种间杂交受精率的影响,以期优化杂交的授精条件,将杂色鲍和盘鲍种间杂交受精率稳定在较高水平。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 亲鲍 实验用杂交亲本杂色鲍和盘鲍分别由台湾省和日本引进并在福建省东山县海田公司亲营鲍鱼养殖场养殖数代的成熟鲍。亲贝催产采用阴干、紫外线照射过海水刺激和流水刺激的方法。配子开始排放时,将正在排放的亲鲍转移到单独的容器中产卵、排精。整个操作过程中,同种雌雄个体间保持5 m以上距离,同时所有的表面及器皿在每一步操作前先用淡水浸洗过。

1.1.2 配子 收集精子,并用血球计数板计数,调整至 $3 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ 左右备用。卵子一经排放立即收集,目测计数,并用膜滤海水调整密度到 300 mL^{-1} 左右。

1.2 实验设置

实验地点是福建省东山县海田公司亲营鲍鱼养殖场。实验均在24孔组织培养板进行,每个实验水平重复3孔,并设置1个空白对照孔(即不加入精子),以监测卵子是否被同种精子污染。除特别说明外,实验用卵子密度控制在 300 mL^{-1} 左右,杂交实验用精子密度控制在 $2.0 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ 左右,自繁实验用精子密度控制在 $5.0 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 左右,试验温度为 21.5°C 。人工授精后,室温孵育,1.5 h后镜检统计受精率。为了方便观察,用卵裂卵数与总卵数的比值反映受精率。实验设置的杂交和自繁组合杂色鲍(♀)×杂色鲍(♂)、杂色鲍(♀)×盘鲍(♂)、盘鲍(♀)×盘鲍(♂)、盘鲍(♀)×杂色鲍(♂)以下分别简写为SS、SJ、JJ、JS。

1.2.1 试验Ⅰ:卵子排放后的时间实验 将刚排放的同一批卵子分为两份,分别用于杂交和自繁受精。杂交组合中,排放的卵子,室温放置2 min、4 min、10 min、20 min、40 min、60 min、80 min后,分别取1 mL卵液,加入预加异种精液的组织培养孔中,轻轻混匀。本实验共做2次,水温分别 18.3°C 和 21.5°C 。

自繁组合中,卵子在室温中放置0.5 h、1 h、2 h、3 h、4 h、5 h和6 h,用同种精子(6°C 保存)受精。

1.2.2 试验Ⅱ:精子排放后的时间实验 精子排放后室温放置0 h、1 h、2 h、3 h、5 h、7 h和9 h后,用于种间杂交授精。实验用卵子是同一批雌鲍产的新鲜卵子。

1.2.3 试验Ⅲ:授精精子浓度实验 在组织培养孔中,将 $1.50 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ 盘鲍精液和 $3.00 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ 盘鲍精液按进行2°梯度稀释,然后在每孔中分别加入1 mL杂色鲍新鲜卵液,将卵子数控制在300个左右,轻轻摇匀。

1.2.4 试验Ⅳ:胰蛋白酶实验 在组织培养孔中依次加入1 mL梯度浓度的胰蛋白酶海水溶液,然后加入0.9 mL杂色鲍卵液和0.1 mL盘鲍精液,使胰蛋白酶的终质量分数分别为0.125%、0.25%、0.5%、1%和2%。

1.2.5 试验Ⅴ:钙离子浓度实验 在组织培养中依次加入含梯度浓度钙离子的膜滤海水,再加入0.9 mL杂色鲍卵液和0.1 mL盘鲍精液,轻轻摇匀,使钙离子终浓度分别为 $0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $2.7 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $5.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10.8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $21.6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $43.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.2.6 试验Ⅵ:pH实验 膜滤海水用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl溶液和NaOH溶液调整出梯度海水,分别取出2 mL调整好pH的海水,加入等体积膜滤海水,测量并记录最后的pH值即为实验pH值。在培养板中分别加入梯度pH膜滤海水1 mL,再加入0.9 mL杂色鲍卵液和0.1 mL盘鲍精液,轻轻摇匀。

1.2.7 试验Ⅶ:水温-卵子排放时间双因素实验 杂色鲍卵液分别放置在 23°C 、 26°C 、 29°C 和 32°C 光照培养箱中,10 min、15 min、20 min、30 min后,加入0.1 mL新鲜盘鲍精液,轻轻摇匀。

1.3 数据统计

用SPSS 12进行单因素方差分析(One-way ANOVA)检验各处理不同水平间差异的显著性。

2 结果

2.1 卵子排放时间

杂色鲍与盘鲍两个方向的杂交受精率均比亲本自繁组合低,而且随卵子排放时间下降的速度远远快于同种自繁组合(图1和图2)。 21.5°C 下,SJ杂交,卵子排放时间2 min时,受精率为 $55.9\% \pm 8.1\%$,4.7 min时受精率已下降了50%(图1A);JS杂交,卵子排放时间为4 min时,受精率为 $31.5\% \pm 9.7\%$,10 min时,即下降为 $9.2\% \pm 7.2\%$ (图1B)。而SS自繁,卵子排放后的时间在5 h内对受精率无显著影响。JJ自繁,卵子排放1 h内对受精率无显著影响(图2)。另一方面, 18.3°C 杂交受精率下降的速度较 21.5°C 慢(图1)。

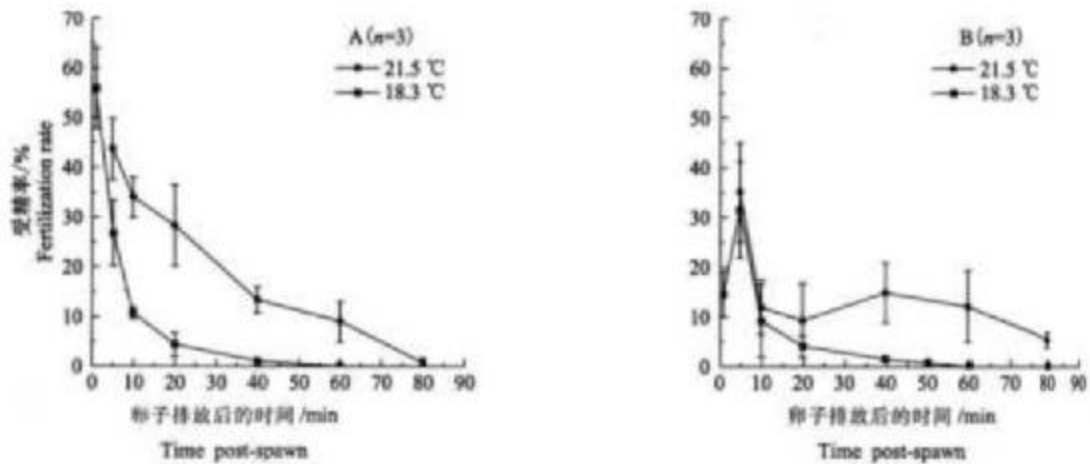


图1 卵子排放后的时间对杂交受精率的影响

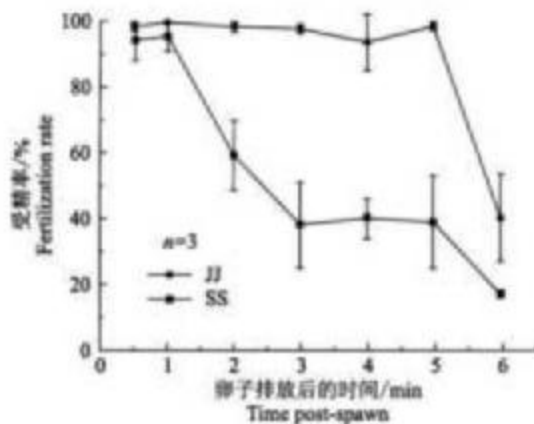
A₁: 杂色鲍(♀)×盘鲍(♂); B₁: 盘鲍(♀)×杂色鲍(♂)Fig.1 Effects of time post egg being spawned on fertilization rate of interspecific hybridization
A₁: *Haliotis diversicolor* (♀) × *H. discus discus* (♂); B₁: *H. discus discus* (♀) × *H. diversicolor* (♂)图2 卵子排放后的时间对自繁受精率的影响(21.5 °C)
SS: 杂色鲍(♀)×杂色鲍(♂); SJ: 盘鲍(♀)×盘鲍(♂)

Fig.2 Effects of time post-spawn on fertilization rate in homspecific cross

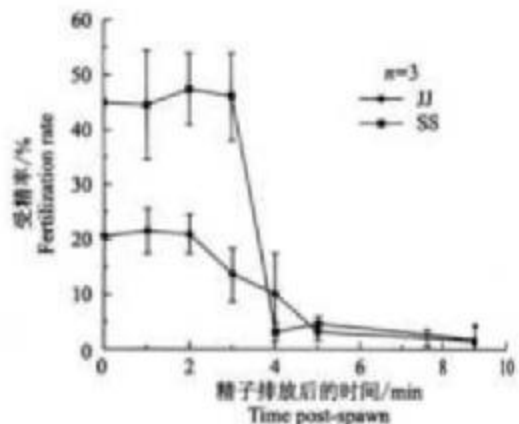
SS: *Haliotis diversicolor* (♀) × *H. diversicolor* (♂); SJ: *H. discus discus* (♀) × *H. discus discus* (♂)图3 精子排放后的时间对杂交受精率的影响(21.5 °C)
SJ: 杂色鲍(♀)×盘鲍(♂); JS: 盘鲍(♀)×杂色鲍(♂)

Fig.3 Effects of the time post-sperm-excretion on fertilization rate (21.5 °C)

SJ: *H. diversicolor* (♀) × *H. discus discus* (♂); JS: *H. discus discus* (♀) × *H. diversicolor* (♂)

2.2 精子排放时间

在SJ杂交组合中,授精精子排放时间在3 h以内,受精率没有显著差异($P=0.92$),3 h后受精率急剧下降至5%以下。JS杂交组合中,精子排放2 h内,受精率没有显著变化($P=0.97$),2 h后才逐渐下降(图3)。

2.3 授精精子浓度

授精精子浓度对受精率的影响如图4所示。SJ杂交,盘鲍精子浓度低于 $3.75 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 就无法使

杂色鲍卵子受精;精子浓度为 $2.4 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ 时,受精率达到最大值;适宜授精精子浓度为 $6.0 \times 10^6 \sim 2.40 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ 。JS杂交,杂色鲍精子浓度低于 $9.38 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$,受精率即低于1.0%;精子浓度为 $7.5 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ 时,受精率达到最大值;适宜授精精子浓度为 $3.8 \times 10^7 \sim 7.5 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ 。

2.4 钙离子浓度

钙离子对杂交受精率的影响如图5所示。SJ杂交受精率随着 Ca^{2+} 浓度的提高而降低,当浓度为

45 mmol·L⁻¹时,受精率下降至 7.20% ± 3.73%。

2.5 胰蛋白酶

胰蛋白酶对 SJ 杂交受精率的影响如图 6 所示。SJ 杂交受精率随着胰蛋白酶浓度的提高而降低,当浓度为 2.0% 时,受精率下降至 0.37% ± 0.64%。

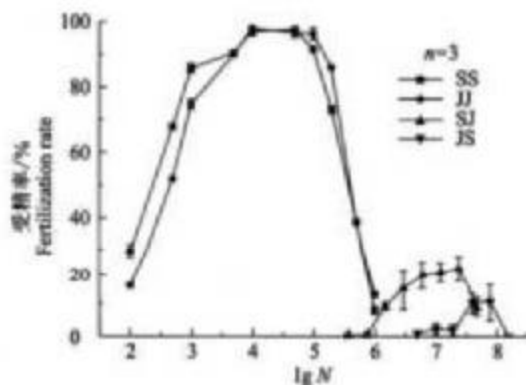


图4 受精精子浓度对杂交和自繁受精率的影响(21.5℃)
SS:杂色鲍(♀)×杂色鲍(♂);JJ:盘鲍(♀)×盘鲍(♂);SJ:杂色鲍(♀)×盘鲍(♂);JS:盘鲍(♀)×杂色鲍(♂);N为精子浓度(mL⁻¹)

Fig.4 Effects of concentrations of sperm on fertilization rate in the heterospecific and pure cross(21.5℃)
SS: *Haliotis diversicolor* (♀) × *H. diversicolor* (♂); JJ: *H. discus discus* (♀) × *H. discus discus* (♂); SJ: *H. diversicolor* (♀) × *H. discus discus* (♂); JS: *H. discus discus* (♀) × *H. diversicolor* (♂); N: Sperm concentration(mL⁻¹)

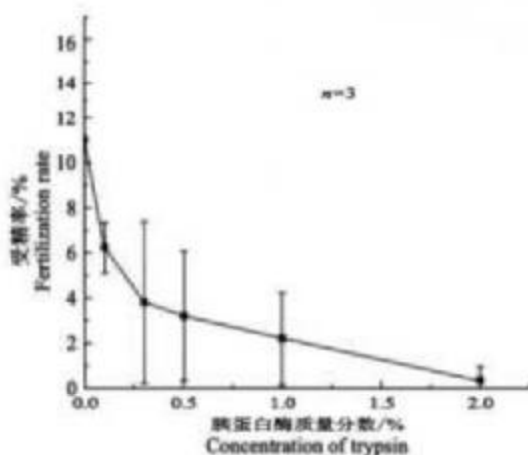


图6 胰蛋白酶浓度对杂色鲍(♀)×盘鲍(♂)杂交受精率的影响(21.5℃)

Fig.6 Effects of concentrations of trypsin on fertilization rate in hybridization in cross of *H. diversicolor* (♀) × *H. discus discus* (♂) (21.5℃)

2.6 pH值

pH对SJ杂交受精率的影响如图7所示,在pH 7.70~8.08时,杂交受精率最高,为(49.0% ± 2.0%)~(51.3% ± 2.0%),提高或降低pH均会使杂交受精率下降。

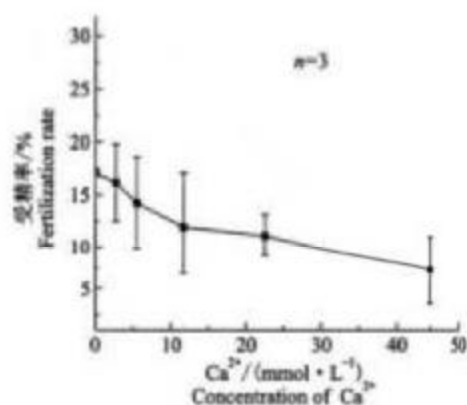


图5 Ca²⁺离子浓度对杂色鲍(♀)×盘鲍(♂)杂交受精率的影响(21.5℃)

Fig.5 Effects of Ca²⁺ concentrations on fertilization rate in hybridization in *H. diversicolor* (♀) × *H. discus discus* (♂) (21.5℃)

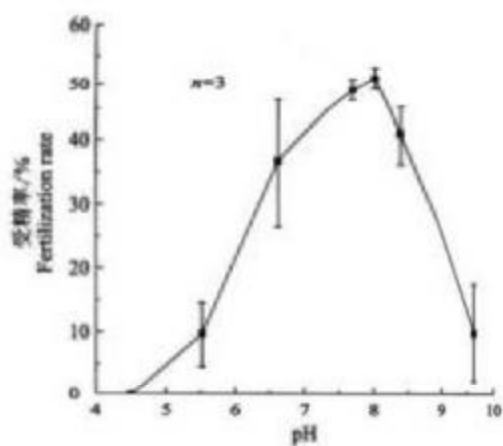


图7 pH对杂色鲍(♀)×盘鲍(♂)杂交受精率的影响(21.5℃)

Fig.7 Effect of pH on fertilization rate in hybridization in the cross of *H. diversicolor* (♀) × *H. discus discus* (♂) (21.5℃)

2.7 水温和卵子排放时间双因素

卵子排放时间在 10 min 时,按受精率由高到低排列分别为 26℃、29℃、23℃、32℃;受精率分别为 $14.7\% \pm 4.1\%$ 、 $13.3\% \pm 2.3\%$ 、 $10.3\% \pm 5.7\%$ 、 $7.4\% \pm 2.3\%$ 。卵子排放时间 20 min 开始,受精率由高到低排列顺序为 23℃、26℃、29℃、32℃;卵子排放 30 min 时,23~32℃受精率依次为 $4.8\% \pm 1.1\%$ 、 $1.9\% \pm 0.9\%$ 、 $1.3\% \pm 1.0\%$ 、 $0.0\% \pm 0.0\%$ (图 8)。可见,卵子排放 10 min 内,26~29℃杂交受精率较高,而水温越高,杂交受精率下降速度越快。

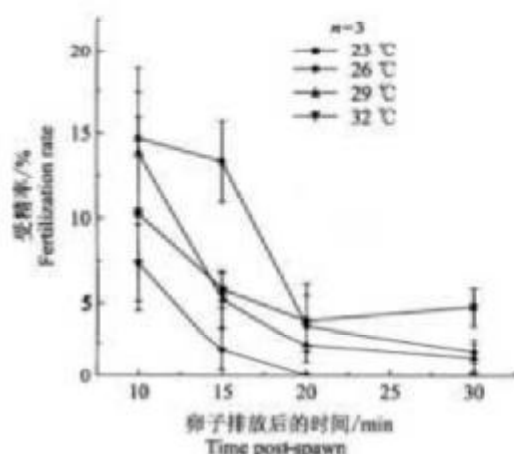


图 8 温度对杂色鲍(♀)×盘鲍(♂)杂交受精率的影响

Fig. 8 Effects of temperatures on fertilization rate in hybridization in the cross of *H. diversicolor* (♀) × *H. discus discus* (♂)

3 讨论

配子不亲和是行体外受精的无脊椎动物最重要的生殖隔离机制之一^[7-10],但不同种类海洋无脊椎动物之间的生殖隔离常常不是绝对的,在海洋无脊椎动物中,近缘种之间的种间杂交较常见^[8]。但是,种间杂交要达到与亲本自繁相同的受精率通常需要在较高浓度的授精精子,而且最高受精率一般比亲本自繁对照要低。例如, *Mytilus edulis* × *M. trossulus* 杂交受精率要达到 20%,其授精精子浓度相当于其亲本自繁相同受精率下精子浓度的 700 倍^[9]。黄鲍(*H. corrugata*)(♀)×红鲍(*H. rufesense*)(♂)杂交的适宜精子浓度比红鲍自繁适宜精子浓度高 10 倍^[2]。本研究结果表明,SJ 杂交的适宜精子浓度为 $6.0 \times 10^6 \sim 2.4 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$,JS 杂交

的适宜精子浓度为 $3.8 \times 10^7 \sim 7.5 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ (图 4),约为同种自繁的 100 倍。鲍受精的种类特异性是由配子识别蛋白结构的种类特异性决定的^[7]。鲍精子顶体内的细胞溶素 (lysine) 及卵子卵黄膜细胞溶素受体 (VERL) 的结构均具有种类特异性,因而,细胞溶素可以特异地作用于同一种鲍的 VERL。在鲍的种间杂交中,增加精子可以提高种间杂交受精率,可能是因为增加精子提高了细胞溶素的浓度,从而增加了细胞溶素与 VERL 错配的机会。

另一方面,海洋无脊椎动物种间杂交受精率常常呈现出正反交配子不亲和程度不平衡的现象,主要表现为两个方向的受精率不等,适宜精子浓度有差异^[10-11]。盘鲍与杂色鲍杂交同样存在正反交配子不亲和程度不同的现象。JS 适宜授精精子浓度约为 SJ 适宜授精精子浓度的 5 倍;而 JS 能达到的最高受精率仅为 SJ 最高受精率的 47.2%。

本研究结果表明,杂色鲍与盘鲍杂交受精率随卵子排放时间快速下降。这种现象也见于白鲍(♀)×红鲍(♂)、粉红鲍(♀)×红鲍(♂)及红鲍(♀)×绿鲍(♂)等杂交组合^[12]。而 Scarpa 和 Allen^[12]在太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)×美洲牡蛎(*C. rivularis*)杂交中观察到受精率并未随卵子排放时间而下降。种间杂交受精率随卵子排放时间快速下降的现象是不是鲍属动物的特点,还需要进行更大范围的杂交实验。杂色鲍与盘鲍杂交受精率下降速度远远快于各自亲本自繁组合,而且下降的速度随着温度的升高而提高。可见,造成种间杂交受精率迅速下降的原因不仅是卵子的老化,而更可能是因为卵子排放到海水后经历了一个成熟的过程,提高了受精的种类特异性。Stephano 和 Gould^[13]在研究太平洋牡蛎的多精受精现象时发现,解剖取出的卵子易发生多精受精现象,但是这些卵子在海水中放置 1.5 h 后,多精受精现象就减少很多;他们认为,卵子在生殖腺中缺乏阻止多精受精的障碍,但排放到海水中后进一步发育便形成此障碍。

温度是影响鲍生长速度、成活率、配子成熟的重要因素。养成阶段,杂色鲍的适温范围为 23~28℃^[14],盘鲍的适温范围 18~24℃^[15]。本研究结果表明,卵子排放时间 10 min 时,在 26~29℃海水中受精,SJ 杂交受精率最高,与杂色鲍生长适温范围相当。杂交受精适宜温度与母本成体的适温范围相当的现象同样见于海湾扇贝(*Argopecten irradians*)和虾

夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)杂交^[16]。可见杂交受精的适温范围主要是由卵子发育生理需求决定的;另一方面,实验结果还表明,温度越高精子活力和卵子代谢速度也加快,受精率下降的速度也越快,可能与较高温度下卵子代谢速度较快有关。

受精作用会导致 Ca^{2+} 内流或胞内 Ca^{2+} 库释放,瞬时提高精子和卵子胞内 Ca^{2+} 浓度,从而启动精子的顶体反应和卵子的皮层反应、代谢和发育^[17-18]。在富 Ca^{2+} ($30\sim 50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)海水中孵育,会提高精卵胞内 Ca^{2+} 浓度,激活卵子^[19],诱导精子发生顶体反应^[20]。 Ca^{2+} 对海水贝类受精影响很大,在无 Ca^{2+} 的人工海水中,皱纹盘鲍受精率仅为对照组的 30% 左右^[21]。本研究试图通过提高胞外钙离子浓度(在海水中添加 $2.7\sim 45\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{CaCl}_2$)来提高杂交受精率,但结果反而导致 SJ 杂交受精率下降。虽然 Sakai 等^[20]用电镜观察到,盘鲍精子在富 Ca^{2+} 海水($30\sim 50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)中孵育,会诱导精子发生 10%~30% 的精子顶体反应,但适时的顶体反应和皮层反应对于受精成功很重要,富钙海水可能引起精子过早发生顶体反应,从而导致杂交受精率下降。

受精作用还会引起 H^+ 外流,导致胞内 pH (pHi)的提高。本研究结果表明,胞外 pH 在接近自然海水时 SJ 杂交受精率最高,提高或降低胞外 pH 均导致受精率下降。李霞等^[21]在研究环境因子对皱纹盘鲍和太平洋牡蛎精子运动能力及受精率的影响时发现,皱纹盘鲍和太平洋牡蛎精子受精的适宜 pH 值范围为 7.0~8.0,同样也是接近自然海水的 pH。可见,虽然在弱碱性的氨海水或普鲁卡因海水中孵育,会激活未受精卵代谢与发育^[22],促进精子活动及顶体反应^[23],但是提高或降低 pH 并不能促进受精作用的完成。

本研究在授精体系中添加胰蛋白酶的结果使 SJ 杂交受精率下降。而日本学者 Osanai^[24]在研究中球海胆(*Strongylocentrotus intermedius*)、马粪海胆(*Hemicentrotus pulcherrimus*)和海刺猬(*Glyptocidaris crenularis*)的种间杂交时,发现用蛋白酶处理后杂交受精率显著提高。这可能与不同物种精卵表面结构和分子组成不同有关。蛋白酶可能损伤鲍卵子或精子表面与完成受精作用相关的物质结构,导致受精率的下降。

综上所述,影响杂色鲍和盘鲍杂交受精率的关

键因素为卵子排放后的时间和精子浓度,本研究优化的受精条件已经应用于本课题组的研究工作中,大大方便了课题组种间杂交子代的培育,也使后续建立杂交家系及开展杂交受精生物学等基础研究成为可能。

参考文献:

- [1] Burtley D M, Rana K, Immink A J. The use of inter-specific hybrids in aquaculture and fisheries[J]. Rev Fish Biol Fisheries, 2000, 10 (3): 325-337.
- [2] Leighton D L, Lewis C A. Experimental hybridization in a-balone[J]. Int J Invert reprod, 1982, 5(5): 273-282.
- [3] 葛宗庆,王家平,李木彬,等. 盘鲍引进养殖与人工育苗实践[J]. 福建水产, 1995(1): 9-16.
- [4] 王仁波,范家春. 红鲍人工育苗及其与皱纹盘鲍杂交实验的初步研究[J]. 大连水产学院学报, 1999, 14: 64-66.
- [5] 张起信,牛明宽,刘光穆,等. 鲍的杂交育种高产技术研究[J]. 海洋科学, 2000, 24(3): 11-13.
- [6] 柯才焕,田 越,周时强,等. 杂色鲍与皱纹盘鲍、盘鲍杂交的初步研究[J]. 海洋科学, 2000, 24: 39-41.
- [7] Kresge N, Vacquier V D, Stout C D. Abalone lysin: the dissolving and evolving sperm protein[J]. Bioessays, 2001, 23(1): 95-103.
- [8] Gardner J P A. Hybridization in the sea[J]. Adv Mar Biol, 1997, 31: 1-78.
- [9] Rawson P D, Slaughter C, Yund P O. Patterns of gamete incompatibility between the blue mussels *Mytilus edulis* and *M. trusulus*[J]. Mar Biol, 2003, 143(2): 317-325.
- [10] Aslan L M, Uehara T. Hybridization and F_1 backcrosses between two closely related tropical species of sea urchin (genus *Echinometra*) in Okinawa[J]. Inv Rep Dev, 1997, 31(1-3): 319-324.
- [11] Pernet B. Gamete interactions and genetic differentiation among three sympatric polychaetes[J]. Evolution, 1999, 53(2): 435-446.
- [12] Scarpa J, Allen S K. Comparative kinetics of meiosis in hybrid crosses of pacific oyster *Crassostrea gigas* and suminoe oyster *C. risoularis* with the American oyster *C. virginica*[J]. J Exp Zool, 1992, 263: 316-322.
- [13] Stephano J L, Gould M. Avoiding polyspermy in the oyster (*Crassostrea gigas*) [J]. Aquaculture, 1988, 73: 295-307.
- [14] 杨瑞琛,游锦华,蔡天来. 杂色鲍人工繁殖的初步研究[J]. 动物学杂志, 1975(1): 9-12.
- [15] 高继生,王 琦,王仁波,等. 鲍鱼[M]. 沈阳:辽宁科学技术出版社, 2000. 13.
- [16] 陈东钊,王子臣. 温度对海湾扇贝与野夷扇贝及其杂交受精、胚胎和早期幼体发育的影响[J]. 大连水产学院学报, 1994, 9 (4): 1-9.
- [17] Yang H S, Ting T T. Artificial propagation and culture of a-

- balone *Haliotis diversicolor supertexta*. Linchke[J]. Bull Taiwan Fish Res Inst, 1986, 40:195-201.
- [18] Darszon A, Labarca P, Nishigaki T, et al. Ion channels in sperm physiology[J]. Physiol Rev, 1999, 79 (2): 481-510.
- [19] Jaffe L F. The role of calcium explosions, waves, and pulses in activating eggs[A]. Biology of Fertilization[M]. New York: Academic Press, 1985. 127-165.
- [20] Sakai Y T, Suzuki F, Shiroya Y. Fine structural changes in the acrosome reaction of the Japanese abalone, *Haliotis discus* [J]. Develop Growth Differ, 1982, 24(6):531-542.
- [21] 李霞,刘淑范,康雷,等. 环境因子对鲍和牡蛎精子运动能力及受精率的影响[J]. 大连水产学院学报, 2002, 17:26-30.
- [22] Miller B S, Epel D. The roles of changes in NADPH and pH during fertilization and artificial activation of the sea urchin egg [J]. Dev Biol, 1999, 216 (1): 394-405.
- [23] Dan J C. Studies on the acrosome : II Acrosome reaction in starfish spermatozoa[J]. Biol Bull, 1954, 107:203-218.
- [24] Oonai K. Promotion of cross fertilization sea urchin eggs treated with proteases[J]. Bull Mar Biol Stat Asamuchi, 1973, 14:205-215.

Influence factors on fertilization rate in laboratory hybridization between *Haliotis diversicolor* and *H. discus discus*

CAI Ming-yi^{1,2}, KE Cai-huan¹, WANG Gui-zhong¹, WANG Zhi-yong², WANG Yi-lei²

(1. Department of Oceanography, Key Laboratory of Marine Environmental Science, Ministry of Education, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. Institute of Aquaculture Biotechnology, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: To overcome the gametic incompatibility of interspecific hybridization between *Haliotis diversicolor* (S) and *H. discus discus* (J), the effects of gametic age, insemination sperm concentrations, Trypsin, Ca^{2+} , pH and temperatures on the fertilization rate were investigated. The results showed that the age of egg and insemination sperm concentration are two important factors influencing the fertilization rate. In comparison with the pure cross, the fertilization rate was low and declined much sharply for the heterospecific cross. At 21.5 °C, the fertilization rate was 100% and did not declined significantly in 1 h post egg spawned for the pure cross, while it was $55.9\% \pm 8.1\%$ at 2 min and declined by 50% at 4.7 min post spawned for the SJ cross, and it was $31.5\% \pm 9.7\%$ at 4 min and declined by 70.9% at 10 min post spawn for the JS cross. The concentrations of sperms yielded maximum fertilization with the least abnormality in subsequent development was $6.0 \times 10^6 - 2.4 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ for the SJ cross, and $3.8 \times 10^7 - 7.5 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ for the reciprocal cross, which were about 100-fold higher than that in homologous cross. Higher temperature accelerated the egg losing the ability of being activated by the heterospecific sperm. For the eggs spawned for less than 10 min, the optimal temperature for hybridization is 26-29 °C. The other tested factors, including the addition of Trypsin or Ca^{2+} into the fertilization system and alteration of pH, led to decline of fertilization rate. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(2):230-236]

Key words: *Haliotis diversicolor*; *Haliotis discus discus*; interspecific hybridization; fertilization rate

Corresponding author: KE Cai-huan. E-mail: chke@xmu.edu.cn