

文章编号: 1000-0615(2000)03-0211-06

四种海胆杂交的可行性及子代的早期发育

常亚青, 王子臣, 宋坚, 苏延明, 王君涛

(大连水产学院农业部海洋水产增养殖生态学重点开放实验室, 辽宁大连 116023)

摘要:报道了中国北部沿海马粪海胆、海刺猬、光棘球海胆三种主要海胆与引自日本的中间球海胆四种海胆之间的不同组合的杂交试验及其子代浮游幼体及幼海胆的早期生长发育。结果表明,采用生殖调控可使不同海胆达到同步繁殖,在8~24℃下各种海胆杂交组合的受精率与亲本亲缘关系有关,同时受到双亲繁殖适宜温度的影响,受精率介于0~69.6%之间,均低于自交组。以马粪海胆和海刺猬为亲本的正反交、以马粪海胆和中间球海胆为亲本的正反交以及马粪海胆(♀)×光棘球海胆(♂)各组杂交胚胎均可发育至四腕幼虫,但畸形率较高,浮游时间比自交组延长3~10d,在其中的3个杂交组得到了幼海胆,经过14个月的室内培育,杂交组成活率低于自交组,壳直径达2.59~2.88 cm。

关键词:海刺猬;马粪海胆;中间球海胆;光棘球海胆;杂交;早期发育

中图分类号:S96 文献标识码:A

Cross breeding between four species of sea urchin, feasibility and early development of F₁ offspring

CHANG Ya-qing, WANG Zi-chen, SONG Jian, SU Yan-ming, WANG Jun-tao

(Key Lab of Marine Ecology in Aquaculture of Ministry of Agriculture, Dalian Fisheries University, Dalian 116023, China)

Abstract: Sea urchins *Hemicentrotus pulcherrimus*, *Glyptocidaris crenularis*, *Strongylocentrotus nudus* and *S. intermedius* are the most important roe source that export to Japan, *S. nudus*, *S. intermedius* and *H. pulcherrimus* have been cultured and released in north area of China Yellow Sea. This paper deals with the probability of their interspecific hybridization. And their hybrid larvae and juvenile characters were also reported. The results show that water temperature control can make the four sea urchin spawning simultaneously. The percentage of fertilization in crossing groups was 0-69.6% and it was affected by consanguinity relationship of their native stocks and the spawning proper water temperatures of their native stocks. The larvae of *H. pulcherrimus* × *G. crenularis*, *G. crenularis* × *H. pulcherrimus*, *H. pulcherrimus* × *S. intermedius*, *S. intermedius* × *H. pulcherrimus* and *H. pulcherrimus* × *S. nudus* can grow to four leg larvae, but the abnormal rate was higher, and the development time of float larvae was 3-10 days longer than that of their native stock offsprings. After 14 months reared indoor, three hybrid juvenile sea urchins were carried out and their test diameter was 2.59-2.88 cm.

Key words: *Glyptocidaris crenularis*; *Hemicentrotus pulcherrimus*; *Strongylocentrotus intermedius*; *Strongylocentrotus nudus*; cross breeding; early development

收稿日期: 1999-10-08

基金项目: 国家科技攻关资助项目(96-D030)

作者简介: 常亚青(1967-),男,博士生,副教授。E-mail: yqchang@263.net

马粪海胆(*Hemicentrotus pulcherrimus*)、海刺猬(*Glyptocidaris crenularis*)和光棘球海胆(*Strongylocentrotus nudus*)是我国、日本等国最主要的3种经济类海胆^[1],中间球海胆(*Strongylocentrotus intermedius*)于1989年由日本北海道引入我国,现已在我国北部沿海开展养殖^[2]。海刺猬最大壳径80 mm,生殖腺品质及价值偏低,生殖季节为春季。马粪海胆个体较小,最大壳径多为60 mm,适温范围广,在0~30℃下都可以生活,生殖腺色泽鲜艳质量较好,生殖季节在3~5月。光棘球海胆最大壳径可达100 mm,生长速度较慢,生殖腺色泽淡黄,质量较好,生殖季节在6~8月,中间球海胆最大壳径可达90 mm,其生殖腺色泽及品质都比较好,生长速度快。上述4种海胆的人工育苗已有报道^[3~6]。我们于1998~1999年开展了海胆的杂交研究,得到了一定数量的杂交子一代,本文首次报道了此四种海胆在不同温度下的几种杂交组合的可行性及杂交子代的早期发育,以便为海胆的遗传育种和增养殖提供科学参考。

1 材料和方法

1.1 亲海胆的暂养与生殖调控

3~4月将各种海胆亲体采捕入池。3月24日中间球海胆(壳径5~7cm)亲体取自大连水产学院养殖场。入池后在自然海水6℃下培养3d后,每天升温1℃,升至15℃后稳定10d左右,再将温度升至18℃恒温培养。4月15日海刺猬(壳径8~9cm)、马粪海胆(壳径5~6cm)和光棘球海胆(壳径7~9cm)采捕于大连小平岛浅海水域。入池后,马粪海胆、海刺猬在自然水温(8~16℃)下培养,光棘球海胆入池后每天升温1℃,升至18℃后稳定培养,暂养、促熟过程中过量投喂海带(*Laminara japonica*)每天全量换水两次,2d清除一次残饵和粪便,控制光在500 lx以下。

1.2 亲海胆的催产

催产采用注射KCl方法。具体是将发育良好的亲海胆阴干30 min左右后,从亲海胆的围口膜处注射 $0.5\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的KCl 1~2 mL。然后将其反口面向上放在培养皿中,使各海胆单独排放,如果发现雌的排放,就将其反口面向上放在加满海水的250 mL锥形瓶上,让海胆将卵排放于瓶中。在催产试验过程中,严禁意外受精现象发生。

1.3 不同亲本组合杂交及自交

共进行了7个组合的杂交和4个自交组对照试验。I组:马粪海胆(♀)×海刺猬(♂);II组:海刺猬(♀)×马粪海胆(♂);III组:马粪海胆(♀)×中间球海胆(♂);IV组:中间球海胆(♀)×马粪海胆(♂);V组:海刺猬(♀)×中间球海胆(♂);VI组:中间球海胆(♀)×光棘球海胆(♂);VII组:马粪海胆(♀)×光棘球海胆(♂);VIII:中间球海胆自交组;IX:马粪海胆自交组;X:海刺猬自交组;XI:光棘球海胆自交组。I~X组均在8℃、12℃、16℃、20℃、24℃(各组温差在 ± 0.2 ℃内)下进行授精试验,具体做法:将收集的卵,分别放到不同温度组的2升烧杯中,将精液用一定量的海水稀释后,对卵进行受精,加入精液的量为自交组精子用量的10~20倍^[3~5]。用显微镜观察各杂交组的受精和胚胎发育情况,受精以出现受精膜为准。

1.4 受精卵的孵化和幼虫培养

各组试验胚胎发育至囊胚期后在16℃下孵化,密度在 $50\text{个}\cdot\text{mL}^{-1}$ 以下,囊胚破膜上浮后,用虹吸法取上层幼虫培养于50 L的容器中,幼虫的培育密度在 $1\text{个}\cdot\text{mL}^{-1}$ 以下,幼虫培育期间日换水2次,3~4d倒池1次。幼虫培育饵料采用纤细角刺藻(*Chaetoceros graalis*)。光强控制在300 lx以下,微充气。二腕至八腕浮游幼虫的投饵量参照文献^[5]。受精率=出现受精膜的卵数/总卵数;孵化率=上浮的囊胚幼虫数/受精卵总数。

1.5 幼海胆的培育及生长性状观察

八腕幼虫浮游后期,附着变态在底栖硅藻波纹板上,各组稚、幼海胆的培育方法见文献[5]。测量、观察各组幼海胆的壳径、壳高和体重以及体色、大棘的性状等。解剖观察杂交子一代幼海胆的性腺,并测量其性腺指数^[2]。

2 结果

2.1 各种海胆性腺的发育与成熟

4月16日、5月4日、6月10日分别对马粪海胆和海刺猬催产,获得了大量的卵和精子,催产率为100%。5月4日对中间球海胆和光棘球海胆进行催产,只得到少量的中间球海胆的精子。6月10日对这两种海胆再次进行催产,得到了一定量的中间球海胆卵和大量的精子,只获得少量的光棘球海胆精子。6月22日对光棘球海胆进行催产,获得大量的光棘球海胆精子和适量卵子。结果表明,4月中旬至6月上旬采捕马粪海胆和海刺猬均可大量获得精子和卵,中间球海胆在600℃积温以下只能得到少量的精子,积温在800℃下可得到适量的卵和大量精子。光棘球海胆积温在800℃时只能得到少量的精子,积温达1000℃以上可获得适量卵子及精子。

2.2 各杂交组在不同温度下的受精率

在8~24℃下各组的受精率见表1。海刺猬(♀)×中间球海胆(♂)(V组)在8~24℃内不受精;马粪海胆(♀)×海刺猬(♂)(I组)和海刺猬(♀)×马粪海胆(II组)2组的受精率均较低,只在12、16℃时介于10%~16%;马粪海胆(♀)×海刺猬(♂)(I组)、海刺猬(♀)×马粪海胆(II组)、马粪海胆(♀)×中间球海胆(♂)(III组)和中间球海胆(♀)×马粪海胆(♂)(IV组)4组受精率均在16℃时达到最高,分别为14.0%、16.0%、62.7%和69.6%,低于和高于16℃受精率均降低。中间球海胆(♀)×光棘球海胆(♂)(VI组)和马粪海胆(♀)×光棘球海胆(VII组)在20℃时的受精率高于其它温度组,分别为43.5%和63.6%,低于和高于20℃受精率均降低。

表1 不同温度下海胆各杂交组的受精率(%)

Tab. 1 The fertilization rates of crossing groups under different temperatures (%)

组别	温度(℃)				
	8.0	12.0	16.0	20.0	24.0
I	5.1	10.0	14.0	0.0	0.0
II	6.6	12.5	16.0	8.8	3.2
III	20.6	31.7	62.7	10.2	0.0
IV	25.2	36.8	69.6	33.3	17.2
V	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
VI	8.9	13.3	30.8	43.5	25.8
VII	24.6	40.0	46.0	63.6	38.5
VIII	82.6	86.4	96.8	92.6	90.7
IX	87.5	94.3	97.9	91.0	73.2
X	81.8	94.0	90.7	76.4	59.5

2.3 各杂交组的胚胎发育

各组受精卵胚胎发育时间见表2。

表2 海胆各杂交组胚胎发育时间

Tab. 2 Times of main development stages for different groups

组别	发育期						
	二细胞	四细胞	八细胞	十六细胞	膜内囊胚	囊胚上浮	原肠
I	3h13min	4h40min	5h50min	7h	9h	18h17min	27h
II	2h3min	3h	4h	5h	8h	16h38min	25h
III	1h13min	1h40min	2h30min	2h50min	4h40min	11h7min	17h
IV	1h13min	1h43min	2h25min	3h	5h	12h20min	19h
VI	1h16min	1h43min	2h25min	3h	5h	滞育	—
VII	1h19min	1h43min	2h25min	3h	5h	11h10min	18h
VIII	1h	1h30min	2h30min	3h	5h	11h	18h
IX	1h30min	2h	3h	4h	7h	14h	21h
X	2h	3h28min	4h30min	5h	8h	16h	25h
XI	1h	1h30min	2h	2h40min	5h30min	10h	15h

从杂交组与自交组的胚胎发育时间比较来看, 马粪海胆(♀) × 海刺猬(♂) (I组) 的胚胎发育时间比双亲马粪海胆(IX) 和海刺猬(X) 均要慢, 海刺猬(♀) × 马粪海胆(♂) (II组) 胚胎发育速度与母本海刺猬相近, 比父本马粪海胆慢。其余 III 组、IV、组和 VII 组均与其父、母本的胚胎发育时间基本一致。中间球海胆(♀) × 光棘球海胆(♂) 发育到囊胚期后胚胎滞育、死亡, 其囊胚很大, 充满整个围卵腔。

I~IV 组在 16℃ 下胚胎发育速度最快, 而 VI 和 VII 组在 20℃ 胚胎发育速度最快。马粪海胆 × 光棘球海胆在 24℃ 下的胚胎发育与在 12~20℃ 下的胚胎发育不同, 正常胚胎发育至膜内囊胚后, 要在膜内转动, 才能破膜上浮, 在 24℃ 下发育至囊胚期时受精膜已经消失, 纤毛囊胚可以转动时即上浮, 上浮时间比在 12~20℃ 下要早 6 h。各组囊胚幼虫的孵化率见图 1。

结果表明, 马粪海胆(♀) × 海刺猬(♂) (I组)、海刺猬(♀) × 马粪海胆(♂) (II组)、马粪海胆(♀) × 中间球海胆(♂) (III组)、中间球海胆(♀) × 马粪海胆(♂) (IV组) 和马粪海胆(♀) × 光棘球海胆(♂) (VII组) 杂交组胚胎可以发育到四腕浮游幼虫。

2.4 杂交子代浮游幼虫期的生长发育

I 组杂交子代胚胎发育到四腕幼虫期, 畸形率达 70% 左右, 即使正常个体摄食情况也不好, 幼虫停滞四腕期不再继续发育。II 组杂交子代四腕幼虫期畸形率达 50% 左右, 其余正常幼虫摄食良好, 可以正常发育, 但发育至八腕后期幼虫的时间比双亲晚 7~10 d。III 组、IV 组和 VII 组杂交子代的四腕幼虫畸形率在 20%~30% 之间, 体长每日增长约 30~35 μm, 胃直径增长约 5 μm, 四腕、六腕和八腕期幼虫发育均比 II 组杂交子代发育好。

2.5 杂交子代幼海胆的变态和生长

II 组杂交子代正常四腕幼虫发育至八腕后期幼虫比双亲晚 7~10 d, 此时数量已极少, 未能采集到变态的幼海胆。III 组、IV 组和 VII 组杂交子代发育至八腕后期幼虫变态的时间均比亲本推后 3~4 d。变态的幼海胆以底栖硅藻(壳直径小于 0.5 cm 时) 和石莼(*Ulva* sp.) 以及海带为食(壳直径大于 0.5 cm 时), 于室内养殖 14 个月时, III 组、IV 组和 VII 组杂交子代幼海胆壳直径分别为 2.59 ± 0.52 cm、2.67 ± 0.43 cm 和 2.88 ± 0.36 cm, 马粪海胆、中间球海胆和光棘球海胆自交组幼海胆壳直径分别为 2.32 ± 0.22 cm、2.74 ± 0.25 cm 和 2.92 ± 0.29 cm。幼海胆生成率分别为 0.012%、0.011% 和 0.003%, 分别占双亲幼海胆生成率平均值的 20%、18% 和 2%, 分别得到了 350 个、230 个和 33 个杂交子一代幼海胆。解剖观察各组杂交子一代幼海胆, 发现各组壳径大于 2.5 cm 的个体均有性腺组织发育, 性腺指数介于 17%~28% 之间。

2.6 杂交子代幼海胆的外观性状

III 组杂交子一代个体总体外观呈绿褐色、褐色, 管足肉色, 与双亲马粪海胆和中间球海胆相同, 但背部棘的色泽具备了双亲 2 种形式, 即有马粪海胆的灰白色棘又有中间球海胆的红褐色棘。不同个体 2 种棘的数量不同, 腹部棘和围口膜为灰白色, 与双亲相同, 个体中有 2/3 体形较圆, 与中间球海胆相近, 另外 1/3 体形较扁, 与马粪海胆相近。IV 组杂交子一代个体总体外观比前 1 种色泽较深, 管足色泽与双亲相同, 背部棘的色泽具备了双亲 2 种形式, 但红褐色棘数量较多, 体形与中间球海胆相同, 较圆。

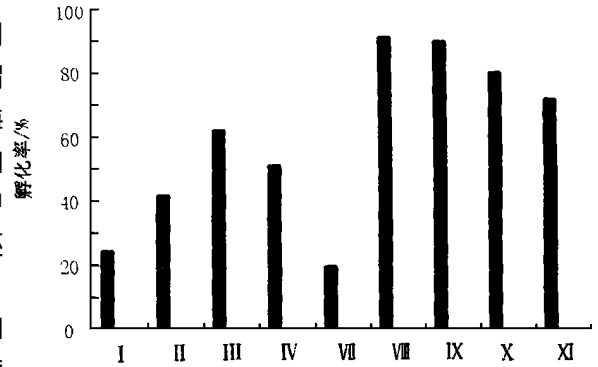


图 1 海胆杂交与自交各组孵化率
Fig. 1 The hatching rate for cross bred and self bred of different sea urchin groups

VII 组杂交子一代个体总体外观呈紫绿红色, 与父本光棘球海胆相同; 但棘呈灰绿色, 与母本马粪海胆相近; 棘较长, 与光棘球海胆相近; 管足呈紫色, 与父本光棘球海胆相同; 围口膜为紫色, 与父本光棘球海胆相同。

3 讨论

3.1 亲海胆采捕、催产与积温的关系

从亲海胆催产结果看, 中间球海胆的积温必须达到 800°C 上才能得到适量的卵和精子, 王子臣、常亚青也得出同样结果^[5]。光棘球海胆积温在 800°C 时只能排出少量精子。马粪海胆、海刺猬在 4~6 月均可获大量的精子。结果表明, 光棘球海胆的促熟需较高的积温, 在前期试验中由于光棘球海胆没有达到所需要的积温, 没有得到卵。所以, 开展上述四种海胆的杂交时, 对积温要求较高的海胆, 要提早入池暂养、促熟, 光棘球海胆和中间球海胆应在 3 月中旬以前采扑入室内促熟培育。同时在催产时注射 KCl 应视个体大小而定, 注射量过大会使未成熟的卵也排出体外, 对杂交受精率影响过大。

3.2 影响杂交受精率的因素

在进行海胆种间杂交试验中, 受精率的差异很大, 影响受精率的主要因素是杂交种之间的亲缘关系及异性配子的亲和性、卵的质量及授精温度。海刺猬在分类地位上属疣海胆科, 而其他 3 种海胆属球海胆科, 故海刺猬与马粪海胆的正反交受精率均很低, 而海刺猬与中间球海胆杂交甚至不受精; 马粪海胆和海刺猬正反交 2 个杂交组异性配子间亲合性差, 因而这两个杂交组的受精率都低。马粪海胆(♀) × 中间球海胆(♂)、马粪海胆(♀) × 光棘球海胆(♂)、中间球海胆(♀) × 马粪海胆(♂) 这三个杂交组异性配子的亲合性最好, 最大受精率都在 60% 以上, 其主要原因是马粪海胆、中间球海胆和光棘球海胆之间的杂交属同科内的种间杂交, 三种海胆的亲缘关系较近, 双亲亲和力高。此外, 卵的质量对受精率的影响也很大, 在种贝催产时注射的 KCl 溶液量要根据海胆个体大小控制在 1~2 mL 以内。

温度对受精率的影响很大。马粪海胆与海刺猬的正反交(I 和 II 组)、马粪海胆与中间球海胆的正反交(III、IV 组) 各组杂交受精率均在 16°C 时最高; 马粪海胆(♀) × 光棘球海胆(♂)、中间球海胆(♀) × 光棘球海胆(♂) 在 20°C 下的受精率最高, 说明杂交受精率的高低受其双亲繁殖适宜温度的影响^[3-6], 特别是父本繁殖适宜温度的影响。在开展海胆杂交时应充分考虑亲本的生活及繁殖适宜水温, 以提高受精率。

3.3 影响杂交后代胚胎发育的因素

从试验的结果来看, I~IV 组和 VII 组均能进行正常的胚胎发育, VI 组发育囊胚后滞育, 试验中发现 VI 和 VII 组子代的囊胚很大, 几乎充满整个围卵腔, 纤毛囊胚不能在膜内转动。马粪海胆、中间球海胆和光棘球海胆的卵子直径分别为 $110\ \mu\text{m}$ 、 $90\ \mu\text{m}$ 和 $110\sim 130\ \mu\text{m}$, 受精后受精膜与卵质膜分别有 $18\sim 25\ \mu\text{m}$ 、 $13\sim 14\ \mu\text{m}$ 和 $26\sim 31\ \mu\text{m}$ 的间隙^[1], 杂交后由于父本的影响导致囊胚增大, 受精膜与卵质膜间隙缩小, 几乎没有围卵腔, 无法利用酶将受精膜弄破孵化出来^[7], 从而导致胚胎滞育死亡。温度对杂交后代胚胎发育速度有很大影响, I 组、II 组、III 组和 V 组在 16°C 下胚胎发育速度最快, 并且随温度的升高畸形率增加, VI 组和 VII 组在 20°C 胚胎发育最快, 随温度的降低胚胎发育速度减慢。VII 组在 24°C 下胚胎发育到囊胚后受精膜消失, 但囊胚仍可以继续发育下去, 但成活率较低, 这与其他文献用无钙海水来去除受精膜后胚胎可继续发育结果一致^[8], 受精膜消失可能是与酶的作用有关, 正常的受精卵发育至纤毛囊胚后, 在膜内不停能动, 借助酶的作用破开此膜^[7], 由于种间杂交, 在 24°C 下使得受精卵的某些理化因子发生变化, 酶在 24°C 被激活, 把受精膜溶解。

3.4 杂种海胆浮游幼虫生长和培养方法

饵料是海胆幼虫生长发育的重要因素, 角刺藻(*Chaetoceros* sp.) 是海胆浮游幼体最合适的饵料之

—^[4~6],在培育杂交海胆的幼虫时采用角刺藻,结果表明摄食良好,幼虫生长也比较正常,但幼虫的附着变态时间比亲本普遍推迟 3~ 10 d,原因有待进一步研究。

3.5 杂交子一代幼海胆的性状

从杂交子代个体的外观来看,各杂交组个体在体表的色泽、背部和腹部棘的颜色、管足和围口膜的色泽、体形等方面均与双亲性状相关,介于双亲性状之间,不同杂交组表现不同,同杂交组个体间也存在差异。统计分析表明,III组和VII组杂交子一代个体壳径大于亲本马粪海胆壳径($p < 0.05$),同时杂交个体之间差异较大。此外,杂交组个体无论在浮游期间还是在附着变态以后,其成活率均低于自交组。

参考文献:

- [1] 高绪生,常亚青.中国经济海胆及其增养殖[M].北京:中国农业出版社,1999.4~ 9.
- [2] 常亚青,王子臣.中间球海胆筏式人工养殖研究[J].大连水产学院学报,1997,12(2):7~ 14.
- [3] 廖承义.马粪海胆人工育苗的初步研究[J].山东海洋学院学报,1985,15(4):71~ 81.
- [4] 廖承义.大连紫海胆人工育苗的初步研究[J].水产学报,1987,11(4):277~ 283.
- [5] 王子臣,常亚青.中间球海胆人工育苗的研究[J].中国水产科学,1997,4(1):60~ 67.
- [6] 常亚青,王子臣,孙培海等.海刺猬人工育苗的初步研究[C].辽宁省第三届青年学术讨论会论文集,信息科学与生物科学分册.沈阳:辽宁大学出版社,1998.508~ 510.
- [7] 曲漱惠,李嘉泳.动物胚胎学[M].北京:人民教育出版社,1989.155~ 158.
- [8] 董宝贤,林泰.马粪海胆的染色体制备和染色体数目[J].青岛海洋大学学报,1991,21(3):129~ 132.

欢迎订购《上海水产大学学报(1992- 1999 光盘版)》

《上海水产大学学报(1992- 1999 光盘版)》是经上海市新闻出版局批准出版发行的电子出版物,将于2000年8月正式推出,它集中了《上海水产大学学报》自1992年创刊至1999年出版的8卷33期(包括为第三届世界华人鱼虾营养研讨会而出版的1期增刊)的内容,共计论文606篇。反映了上海水产大学在此时段内的教学和科研成果,为广大从事水产科学研究人员提供了大量水产科研的信息,具有一定的使用和收藏价值。全套CD-ROM光盘共1张,定价300元(含邮费)。欲订购者可直接汇款至上海市军工路334号《上海水产大学学报》编辑部,邮编:200090。