

葡萄牙牡蛎与熊本牡蛎种间配子亲和力及合子育性分析

苏家齐¹, 王昭萍^{1*}, 张跃环², 喻子牛², 李琼珍³, 闫喜武⁴

(1. 中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266071;

2. 中国科学院南海海洋研究所, 热带海洋生物资源与生态重点实验室, 广东 广州 510301;

3. 广西壮族自治区水产科学研究院, 广西 南宁 530021;

4. 大连海洋大学水产与生命学院, 辽宁省贝类良种繁育工程技术研究中心, 辽宁 大连 116023)

摘要: 为了评估葡萄牙牡蛎(AA)与熊本牡蛎(SS)的种间配子亲和性及合子育性,以成熟的这两种牡蛎为材料,研究了温度(18、21、24、27和30℃)、盐度(16、20、24、28和32)对其受精率、孵化率的影响;在最优环境条件组合下,估算了不同精子浓度下(10^0 、 10^1 、 10^2 、 10^3 和 10^4 个/ μL)受精率及孵化率的 F_{50} 临界值。结果表明,SS、AA及SA受精率和孵化率随着温度升高先上升后下降,在27℃时出现最大值,分别为 $99.1\% \pm 0.3\%$ 、 $98.4\% \pm 1.2\%$ 和 $81.3\% \pm 2.8\%$;孵化率变化趋势与受精率相似,也在27℃时出现最大值,分别为 $99.1\% \pm 0.5\%$ 、 $96.8\% \pm 2.8\%$ 和 $67.1\% \pm 5.5\%$ 。SS和SA在盐度24时出现最高受精率,分别为 $98.8\% \pm 1.3\%$ 和 $81.1\% \pm 7.4\%$,AA为 $94.8\% \pm 4.5\%$;SS和SA在盐度24时出现最大孵化率,分别为 $75.9\% \pm 3.7\%$ 和 $66.1\% \pm 4.5\%$,此时AA孵化率为 $86.4\% \pm 4.2\%$ 。在温度27℃、盐度24环境条件下,SA和AA在精子浓度 10^3 个/ μL 时受精率最高,分别为 $92.4\% \pm 1.2\%$ 和 $87.2\% \pm 5.7\%$,SS受精率为 $92.5\% \pm 2.2\%$;此时的孵化率分别为 $82.2\% \pm 7.0\%$ 、 $78.9\% \pm 7.8\%$ 和 $79.8\% \pm 4.3\%$,各实验组间无显著差异。采用一元二次方程估算,SA受精率 F_{50} 值的精子浓度为58.88个/ μL ,孵化率 F_{50} 值的精子浓度为208.93个/ μL 。本研究为葡萄牙牡蛎与熊本牡蛎生殖隔离机制及其种间杂交奠定了理论与实践基础。

关键词: 葡萄牙牡蛎; 熊本牡蛎; 配子亲和力; 合子育性; 生殖隔离

中图分类号: Q 321; S 968.3

文献标志码: A

葡萄牙牡蛎(*Crassostrea angulata*),又称福建牡蛎,由于其遗传组成与长牡蛎(*C. gigas*)极其相似,曾经一度被国外学者认为是长牡蛎,现如今被重新定义为长牡蛎的一个亚种^[1]。我国学者们曾经将南方巨蛎属(*Crassostrea*)的葡萄牙牡蛎误认为是小蛎属(*Scostrea*)的僧帽牡蛎(*Scostrea cucullata*),经过分子识别,发现这种牡蛎与欧洲的葡萄牙牡蛎是一个物种^[2]。葡萄牙牡蛎主要分布在我国南方高温、高盐海域,核心分布区域为福建,具有生长快、产量高等优点,其年产量在150多万t,是我国产量最高的牡蛎经济种^[3]。而熊本牡蛎(*C. sikamea*),曾经被定义为长牡蛎的一个亚种,而后学者们通过其与

长牡蛎杂交实验,发现两个亚种间存在着单向受精现象,进一步利用分子识别手段将其确认为一个独立物种^[4-5]。它主要分布在日本有名海(日本九州岛以西)、韩国沿海及我国南方高温、中高盐海域,核心分布区为浙江;由于其味道鲜美,深受广大消费者青睐,尤其是在美国市场上可以填补长牡蛎、美洲牡蛎(*C. virginica*)在繁殖季节销售的不足,其市场价值极高^[6-7]。作为我国南方沿海两种重要的牡蛎经济种,它们经常一起生活在同一个海湾,存在着较多生活重叠区,但它们如何回避种间生殖隔离障碍来维持物种单一性的机理有待于研究^[8]。

为此,本研究在实验室条件下模拟了外界环

收稿日期:2014-10-08 修回日期:2015-01-07

资助项目:国家自然科学基金(33712403);国家重点基础研究发展规划(2010CB126400)

通信作者:王昭萍,E-mail:zpwang@ouc.edu.cn

境因子及精子浓度水平对其配子亲和力及合子育性的影响,旨在为这两个物种生殖隔离机制及种间杂交研究奠定理论与实践基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

于2014年4月下旬,以2013年在中国科学院南海海洋研究所湛江海洋经济动物实验站生产的葡萄牙牡蛎和熊本牡蛎子一代各1 000个个体为材料,置于广西贝类综合试验站20 m³水泥池中进行性腺促熟,每天投喂云微藻(*Chlorella* sp.) 3×10^4 个/mL,换水30%,20 d后两种牡蛎性腺同步成熟。促熟期间,水温25.2~28.0℃,盐度24~28,pH 7.92~8.54。

1.2 实验设计

针对葡萄牙牡蛎繁殖季节水温一般不高于30℃,盐度大多不低于18;而熊本牡蛎繁殖季节水温基本均在20℃以上,盐度不超过30,本研究分别设计5个温度梯度(18、21、24、27和30℃)及5个盐度梯度(16、20、24、28和32),每个梯度重复实验12次,以查明温度和盐度对两种牡蛎种间配子亲和性的影响。采用解剖方法获取牡蛎精卵,选取配子优良的个体用于实验。实验在1 000 mL烧杯中进行,卵子密度控制在30~40个/mL。温度实验中,利用恒温箱控制温度,盐度控制在24;盐度实验中,利用盐度28的海水作为母液,利用经过24 h曝气的淡水来配置16、20和24盐度梯度,采用粗盐配制盐度为32的海水,温度一直控制在27℃。

参照Banks等^[9],Lyu等^[10]对牡蛎种间配子亲

和性格局分析,本实验设计了 10^0 、 10^1 、 10^2 、 10^3 和 10^4 个/ μL 5个精子浓度梯度。其中,精子通过血球计数板来测定密度,卵子密度控制在40~50个/mL。在温度27℃、盐度24的条件下,采用1 000 mL烧杯作为实验容器,每个梯度开展12次重复实验。

1.3 F_{50} 临界值计算

为了探讨精子浓度与配子亲和力及合子育性之间的关系。参照Rawson等^[11]及张跃环等^[12]的配子亲和性分析方法,制定了牡蛎种间配子及合子的 F_{50} 临界值(配子发生50%受精率或孵化率时的精子浓度)。采用如下二次函数公式来计算 F_{50} 临界值:

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

式中: y 表示受精率(%)或孵化率(%), x 表示精子浓度的对数[lg(精子浓度/ μL)], a 为二次项系数, b 为一次项系数, c 为常数。

1.4 数据处理

为了减小方差齐性,所有受精率及孵化率均转化为反正弦函数 Asin ,精子浓度转化为常用对数lg。利用SPSS 18.0统计软件对数据进行分析处理,不同实验组间数据比较采用单因素方差分析方法(Turkey HSD),差异显著性设置为 $P < 0.05$,极显著设置为 $P < 0.01$,Excel作图。

2 结果

2.1 温度对牡蛎受精率及孵化率的影响

熊本牡蛎(SS)、葡萄牙牡蛎(AA)及种间杂种(SA)受精率随着温度升高先上升后下降,在27℃时出现最大值,分别为 $99.1\% \pm 0.3\%$ 、 $98.4\% \pm 1.2\%$ 和 $81.3\% \pm 2.8\%$ (图1-a)。表1

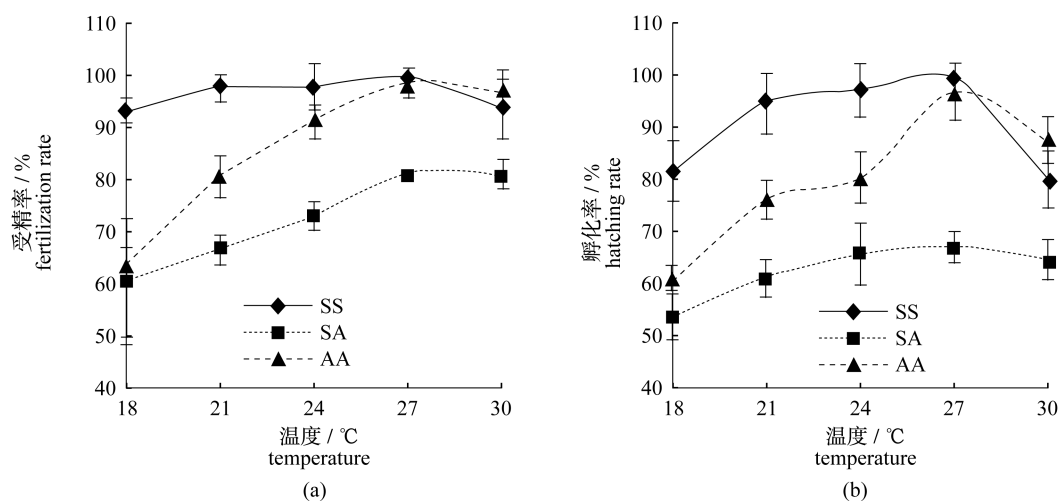


图1 温度对配子亲和力及合子育性的影响

Fig. 1 Effect of temperature on gamete compatibility and zygote fertility

表 1 温度对配子亲和力及合子育性影响的方差分析

Tab.1 Analysis of variance for the effect of temperature on gamete compatibility and zygote fertility

	温度/℃ temperature	df	MS	P	多重比较 multiple comparison
受精率/% fertilization rate	18	2	0.811	<0.001 **	SS ^a > AA ^b > SA ^b
	21	2	0.352	0.001 **	SS ^a > AA ^b > SA ^b
	24	2	0.288	0.004 **	SS ^a > AA ^b > SA ^b
	27	2	0.327	0.001 **	SS ^a > AA ^a > SA ^b
	30	2	0.146	0.012 *	AA ^a > SS ^a > SA ^b
孵化率/% hatching rate	18	2	0.148	0.001 **	SS ^a > AA ^b > SA ^b
	21	2	0.256	0.011 *	SS ^a > AA ^b > SA ^b
	24	2	0.308	0.007 **	SS ^a > AA ^b > SA ^b
	27	2	0.593	0.001 **	SS ^a > AA ^a > SA ^b
	30	2	0.103	0.003 **	AA ^a > SS ^a > SA ^b

注: * 表示差异显著 ($P < 0.05$), ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$); 上标字母不同者表示两两比较差异显著, 下同

Notes: one asterisk means difference ($P < 0.05$), and two asterisk means significant difference ($P < 0.01$); groups with different superscripts have significant difference, the same meaning was described as below

方差分析结果表明,在 18~21 °C 时,SS 受精率显著高于 AA 及 SA ($P < 0.05$);24 °C 时,SS 受精率显著高于 SA ($P < 0.05$),与 AA 无显著差异 ($P > 0.05$);在 27~30 °C 之间时,SS 与 AA 受精率无显著差异 ($P > 0.05$),均显著高于 SA ($P < 0.05$)。

孵化率变化趋势与受精率相似,也是在 27 °C 时出现最大值,分别为 99.1% ± 0.5%、96.8% ± 2.8% 和 67.1% ± 5.5% (图 1-b)。在 18~24 °C 时,SS 受精率显著高于 AA 及 SA ($P < 0.05$),SS 与 SA 之间无显著差异 ($P > 0.05$);27~30 °C 时,SS 与 AA 受精率均显著高于 SA ($P < 0.05$),但二者间无显著差异 ($P > 0.05$) (表 1)。温度是影响 SS、SA 和 AA 实验组受精率及孵化率的最主要环境因子 (表 2)。

2.2 盐度对受精率及孵化率的影响

各实验组受精率均随着盐度升高先上升后下降,SS 和 SA 在盐度 24 时出现最高受精率,分别为 98.8% ± 1.3% 和 81.1% ± 7.4%;AA 在盐度 28 时的最高受精率为 99.0% ± 0.8% (图 2-a)。盐度 16 时,SS 受精率显著高于 AA 及 SA ($P < 0.05$),而 AA 及 SA 之间无显著差异 ($P > 0.05$);盐度 20~24 时,SS 受精率高于 AA,显著大于 SA

($P < 0.05$);盐度 28~32 时,AA 受精率高于 SS,显著大于 SA ($P < 0.05$)。

盐度 16 时,SS 孵化率最高,显著高于 SA,与 AA 无显著差异 (表 3);盐度 20~32 时,AA 孵化率最高,SS 居中,SA 最低。SS、SA 在盐度 24 时出现最大孵化率,分别为 75.9% ± 3.7% 和 66.1% ± 4.5%,此时 AA 孵化率为 86.4% ± 4.2%;盐度 28~32 期间,SA 孵化率明显下降,显著小于双亲对照组 SS 和 AA (图 2-b)。

盐度是影响 SS、SA 和 AA 受精率主要环境因子,尤其是对葡萄牙牡蛎具有显著影响,但是对于熊本牡蛎孵化率影响不显著。经过双因子分析模型估算,温度与盐度的交互作用对 SA 受精率及孵化率均具有显著影响,也对 SS 孵化率具有显著影响 (表 3)。

表 2 温度 (T)、盐度 (S) 作用对配子亲和力及合子育性的影响

Tab.2 Analyses of variance showing temperature and salinity effects for gamete compatibility and zygote fertility

	类别 item	来源 source	df	MS	P
受精率/% fertilization rate		T	4	0.314	<0.001 ***
	SS	S	4	0.270	<0.001 ***
		T × S	1	0.238	0.053
		T	4	0.190	<0.001 ***
	SA	S	4	0.108	<0.001 ***
		T × S	1	0.235	0.007 **
孵化率/% hatching rate		T	4	0.210	0.006 **
	AA	S	4	0.253	0.008 **
		T × S	1	0.133	0.214
		T	4	0.358	<0.001 ***
	SS	S	4	0.003	0.582
		T × S	1	1.117	<0.001 ***
孵化率/% hatching rate		T	4	0.097	<0.001 ***
	SA	S	4	0.169	<0.001 ***
		T × S	1	1.514	<0.001 ***
		T	4	0.270	<0.001 ***
	AA	S	4	0.187	0.004 **
		T × S	1	0.175	0.075

注: T × S 表示温度与盐度的交互作用, *** 表示 $P < 0.001$

Notes: T × S indicates the interaction between temperature and salinity, *** indicates $P < 0.001$

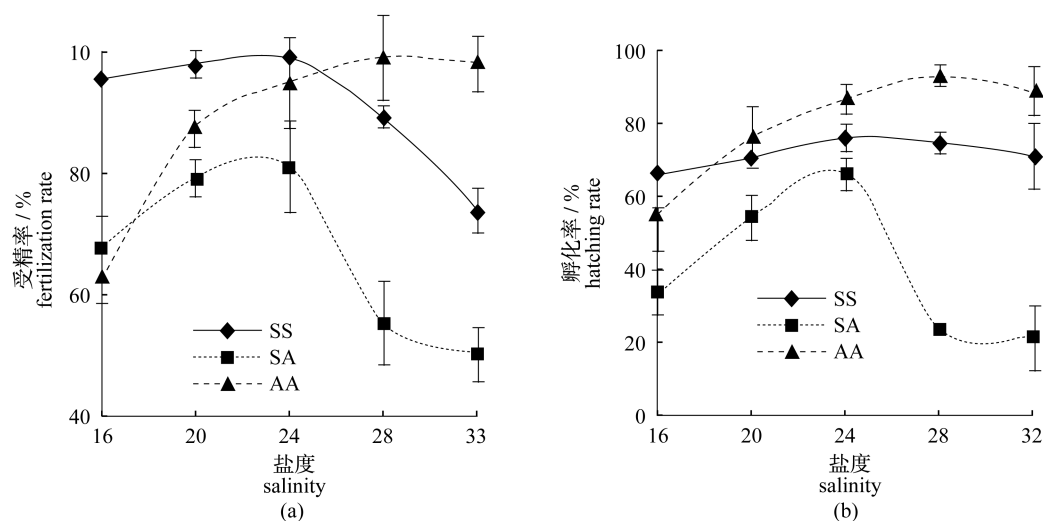


图2 盐度对配子亲和力及合子育性的影响

Fig. 2 Effect of salinity on gamete compatibility and zygote fertility

表3 盐度对配子亲和力及合子育性影响的方差分析

Tab. 3 Analysis of variance for the effect of salinity on gamete compatibility and zygote fertility

	盐度 salinity	df	MS	P	多重比较 multiple comparison
受精率/ fertilization rate	16	2	0.726	<0.001 **	SS ^a > SA ^b > AA ^b
	20	2	0.172	0.003 **	SS ^a > AA ^{ab} > SA ^b
	24	2	0.215	0.035 *	SS ^a > AA ^{ab} > SA ^b
	28	2	0.469	0.002 **	AA ^a > SS ^a > SA ^b
	32	2	0.600	<0.001 *	AA ^a > SS ^{ab} > SA ^b
孵化率/ hatching rate	16	2	0.168	0.002 **	SS ^a > AA ^a > SA ^b
	20	2	0.009	0.015 *	AA ^a > SS ^a > SA ^b
	24	2	0.407	<0.001 **	AA ^a > SS ^{ab} > SA ^b
	28	2	0.698	<0.001 **	AA ^a > SS ^a > SA ^b
	32	2	0.810	0.001 **	AA ^a > SS ^a > SA ^b

2.3 精子浓度对受精率及孵化率的影响

SA、AA 在精子浓度 10^3 个/ μL 时受精率最高,分别为 $92.4\% \pm 1.2\%$ 和 $87.2\% \pm 5.7\%$,此时 SS 受精率为 $92.5\% \pm 2.2\%$,且 3 个实验组间无显著差异(表 4, $P > 0.05$)。对于 SS、AA 而言,不同精子浓度下的受精率分别为 $83.2\% \sim 94.8\%$ 和 $56.4\% \sim 87.2\%$ 。然而,对于 SA 而言,精子浓度低于 10^2 个/ μL 时,受精率仅仅维持在 $3.9\% \sim 8.3\%$,显著小于双亲对照组 ($P < 0.05$);精子浓度为 10^2 个/ μL 时,受精率为 $60.9\% \pm 7.5\%$,仍然显著低于双亲组 ($P < 0.05$);当精子浓度 $\geq 10^3$ 个/ μL 时,受精率 $\geq 90\%$ (图 3-a)。由此可见,精

子浓度对于自交组而言,影响相对较小,但对于种间杂交组至关重要。

表4 精子浓度对配子亲和力及合子育性影响的方差分析

Tab. 4 Analysis of variance for the effect of sperm concentration on gamete compatibility and zygote fertility

	精子浓度/ (个/ μL) sperm concentration	df	MS	P	多重比较 multiple comparison
受精率/ fertilization rate	10^0	2	0.678	<0.001 **	SS ^a > AA ^b > SA ^c
	10^1	2	0.866	<0.001 **	SS ^a > AA ^b > SA ^c
	10^2	2	0.154	0.002 *	SS ^a > AA ^b > SA ^c
	10^3	2	0.012	0.244	SS ^a > SA ^a > AA ^a
	10^4	2	0.110	0.030 *	SS ^a > SA ^a > AA ^b
孵化率/ hatching rate	10^0	2	0.500	<0.001 **	SS ^a > AA ^b > SA ^c
	10^1	2	0.732	<0.001 *	SS ^a > AA ^b > SA ^c
	10^2	2	0.170	0.002 **	SS ^a > AA ^a > SA ^b
	10^3	2	0.003	0.822	SS ^a > SA ^a > AA ^a
	10^4	2	0.149	0.006 **	SS ^a > SA ^{ab} > AA ^b

SS、AA 和 SA 实验组孵化率在精子浓度 10^3 个/ μL 条件下最高,分别为 $82.2\% \pm 7.0\%$ 、 $78.9\% \pm 7.8\%$ 和 $79.8\% \pm 4.3\%$,3 个实验组间无显著差异(表 4, $P > 0.05$)。精子浓度低于 10^1 个/ μL 时,SS 孵化率最高,AA 居中,SA 最低,且 3 个实验组间差异显著 ($P < 0.05$);精子浓度为 10^2 个/ μL 时,SS 与 AA 孵化率差异不显著 ($P > 0.05$),但显著高于 SA 实验组 ($P < 0.05$);精子

浓度为 10^4 个/ μL 时,SA 孵化率与双亲组间无显著差异(表 4, $P > 0.05$)(图 3-b)。

经过一元二次方程估算,SA 受精率的 F_{50} 值为 58.88 个/ μL ,孵化率的 F_{50} 值为 208.93 个/ μL ;

AA 孵化率的 F_{50} 值为 2.71 个/ μL ,受精率均在 50% 以上;由于 SS 受精率及孵化率均在 50% 以上,尚未获得该实验组受精率及孵化率的 F_{50} 值(表 5)。

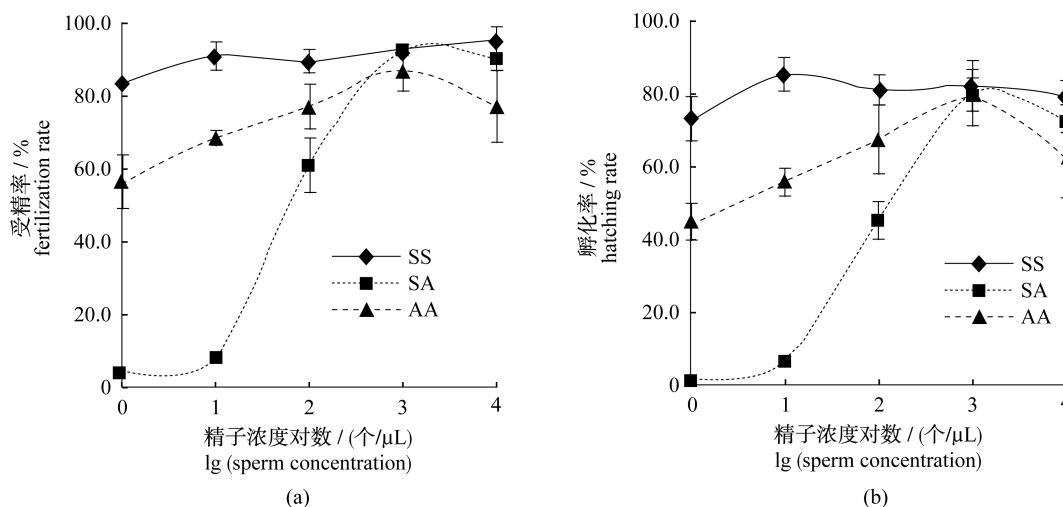


图 3 精子浓度对配子亲和性及合子育性的影响

Fig. 3 Effect of sperm concentration on gamete compatibility and zygote fertility

表 5 不同精子浓度下配子亲和性及合子育性的 F_{50} 临界值。

Tab. 5 The critical value of F_{50} for gamete compatibility and zygote fertility under different sperm concentration conditions

	类别 item	F_{50}	公式 formula	x 范围 x range	R^2
受精率/% fertilization rate	SS	nd	$y = -0.423 8x^2 + 4.181 9x + 84.326$	0 ~ 4	0.845 3
	SA	1.77(58.88)	$y = -2.414 3x^2 + 35.377x - 5.101 9$	0 ~ 4	0.904 0
	AA	nd	$y = -3.050 9x^2 + 18.322x + 55.159$	0 ~ 4	0.673 0
孵化率/% hatching rate	SS	nd	$y = -1.669 0x^2 + 7.626 2x + 75.029$	0 ~ 4	0.619 5
	SA	2.32(208.93)	$y = -2.042 9x^2 + 29.898x - 6.212 4$	0 ~ 4	0.898 4
	AA	0.43(2.71)	$y = -3.835 7x^2 + 21.273x + 42.495$	0 ~ 4	0.862 7

注: F_{50} 中第一个数字表示数量级,括号里面表示精子浓度(个/ μL);“nd”表示没有数据

Notes: the first number indicates quantitative level, the corresponding sperm concentration was represented in parentheses; “nd” indicates no data

3 讨论

3.1 配子亲和力分析

雌性熊本牡蛎可以与雄性葡萄牙牡蛎受精,其种间配子亲和力较强,但相反方向不能发生,存在着单向受精(one-way fertilization)现象。然而, Xu 等^[13]发现葡萄牙牡蛎卵子也可以与熊本牡蛎精子以万分之一比例受精,获得杂种幼虫,但该幼虫无法存活。经过实验反复论证,认为产生该现象的原因可能是熊本牡蛎精子结合素蛋白识别错误造成的,出现了极少量受精现象的发生^[3]。我国学者已经发现雌性香港牡蛎(*C.*

hongkongensis)与雄性长牡蛎、葡萄牙牡蛎和近江牡蛎(*C. ariakensis*)等的杂交组合及雌性近江牡蛎与雄性熊本牡蛎等杂交组合存在着明显的单向受精现象,而且论证了这种现象是由精子结合素蛋白结构快速进化导致的^[14-21]。

这种单向受精现象不受温度、盐度和精子浓度等的影响。本研究中,熊本牡蛎配子亲和力具有较好的盐度适应性,但是受温度影响较大;葡萄牙牡蛎配子亲和力具有极好的温度适应性,但受盐度影响变化较大;而种间杂种的配子亲和力除了受温度、盐度影响以外,主要受精子浓度影响,适当提高精子浓度有利于杂种形成,这为今后远

缘杂交制种提供了理论基础。

3.2 合子育性分析

杂交不育 (hybrid sterility) 包括性腺不育 (gonad sterility)、配子不育 (gamete sterility) 及合子不育 (zygote sterility) 3 种类型。其中, 合子不育是指在远缘杂交过程中, 精卵可以识别受精, 但是无法进行胚胎发育或胚胎不活的现象, 是生殖后隔离的一种主要形式^[22-23]。

对于海洋双壳贝类而言, 合子不育就是指可以受精, 但是无法发育至 D 型幼虫或者发育至 D 型幼虫以后无法继续发育下去的现象^[24]。本研究表明, 熊本牡蛎卵子与葡萄牙牡蛎精子杂交后可以获得正规 D 型幼虫, 具有较好的合子育性; 但是学者们发现的葡萄牙牡蛎卵子与熊本牡蛎精子杂交后获得的杂种 D 型幼虫无法继续发育存活, 停滞在 D 型幼虫阶段, 属于合子不育现象。葡萄牙牡蛎与熊本牡蛎的合子育性与配子亲和力正相关, 在不同温度、盐度条件下, 随着受精率增大, 孵化率升高, D 型幼虫产量增加。然而, 精子浓度适当增高会获得较高的受精率, 但是如果超过了合理范围, 其孵化率会随着精子浓度增大而降低, 甚至会出现接近 100% 畸形胚胎。合子育性与配子亲和力在一定条件下具有正相关作用, 随着受精率增大, 孵化率增高, 但是如果超过了适宜范围, 就会出现二者之间的负相关现象。为此, 在进行种间杂交工作的时候, 适当地提高精子浓度有利于远缘杂种形成。

以温度、盐度及精子浓度对葡萄牙牡蛎与熊本牡蛎的配子亲和力及合子育性的影响进行了研究, 发现二者均对杂交子代形成具有显著影响。同时, 确定了温度 27 ℃、盐度 24, 精子浓度为 10³ 个/μL 为最佳杂交条件, 为解析两种牡蛎生殖隔离机制及其种间杂交提供了理论基础与实践经验。

参考文献:

- [1] Zheng H P, Wang D W, Lin Q, *et al.* Hybridization between the two close related species *Crassostrea gigas* and *C. angulata* and heterosis for growth and survival at early stage of life history [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36 (2): 210 - 215. [郑怀平, 王迪文, 林清, 等. 太平洋牡蛎与葡萄牙牡蛎两近缘种间杂交及其早期阶段生长与存活的杂种优势. *水产学报*, 2012, 36 (2): 210 - 215.]
- [2] Lin Q, Wang Y J, Wang D W, *et al.* Comparison analysis of quantitative traits and path between two cultured populations of *Crassostrea gigas* and *C. angulata* [J]. *Marine Science Bulletin*, 2014, 33 (1): 106 - 111. [林清, 王亚骏, 王迪文, 等. 太平洋牡蛎和葡萄牙牡蛎养殖群体数量性状比较分析. *海洋通报*, 2014, 33 (1): 106 - 111.]
- [3] Zhang Y H, Wang Z P, Yu Z N, *et al.* A recent review of interspecific hybridization among cultivate oyster [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38 (4): 613 - 624. [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. *水产学报*, 2014, 38 (4): 613 - 624.]
- [4] Teng S S, Li Q, Li J R. Cytological observations of nuclear behavior and comparative growth of the hybrids between *Crassostrea gigas* and *C. sikamea* [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2010, 41 (6): 914 - 922. [藤爽爽, 李琪, 李金蓉. 长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 与熊本牡蛎 (*C. sikamea*) 杂交的受精细胞学观察及子一代的生长比较. *海洋与湖沼*, 2010, 41 (6): 914 - 922.]
- [5] Xu F, Li L, Zhang G, *et al.* Effects of salinity on larvae of the oysters *Crassostrea ariakensis*, *C. sikamea* and the hybrid cross [J]. *Marine Biology Research*, 2011, 7 (8): 796 - 803.
- [6] Jorge C M, Rebeca V Y, Yanet GR. Early Gametogenesis of Kumamoto oyster (*Crassostrea sikamea*) [J]. *Hidrobiologica*, 2012, 22 (2): 181 - 184.
- [7] Wang H, Qian L, Wang A, *et al.* Occurrence and distribution of *Crassostrea sikamea* (Amemiya 1928) in China [J]. *Journal of Shellfish Research*, 2013, 32 (2): 439 - 446.
- [8] Ren J, Liu X, Jiang F, *et al.* Unusual conservation of mitochondrial gene order in *Crassostrea* oysters: Evidence for recent speciation in Asia. *BMC Evolutionary Biology*, 2010, 10: 394.
- [9] 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.
- [10] Lyu S, Allen S K. Effect of sperm density on hybridization between *Crassostrea virginica*, Gemelin and *C. gigas* (Thunberg) [J]. *Journal of Shellfish Research*, 1999, 18 (2): 459 - 464.
- [11] 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.
- [12] Zhang Y H, Wang Z P, Yan X W, et al. Analysis of gamete compatibility between *Crassostrea hongkongensis* and *C. gigas* [J]. Acta Ecologica Sinica, 2013, 33(10):3047-3055. [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. 生态学报, 2013, 33(10):3047-3055.]
- [13] Xu F, Li L, Wang J, et al. Use of high-resolution melting analysis for detecting hybrids between the oysters *Crassostrea sikamea* and *C. angulata* reveals bidirectional gametic compatibility [J]. Journal of Molluscan Studies, 2014, 80(4):435-443.
- [14] 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]. International Journal of Developmental Biology, 2008, 52(5-6):759-768.
- [15] Wu Q, Li L, Zhang G. *Crassostrea angulata* bindin gene and the divergence of fucose-binding lectin repeats among three species of *Crassostrea* [J]. Marine Biotechnology, 2011, 13(2):327-335.
- [16] Camara M D, Davis J P, Sekino M, et al. The Kumamoto oyster *Crassostrea sikamea* is neither rare nor threatened by hybridization in the Northern Ariake Sea, Japan [J]. Journal of Shellfish Research, 2008, 27(2):313-322.
- [17] Allen S K, Gaffney P M, Scarpa J, et al. Inviabile hybrids of *Crassostrea virginica* (Gmelin) with *C. rivularis* (Gould) and *C. gigas* (Thunberg) [J]. Aquaculture, 1993, 113(4):269-289.
- [18] Xu F, Zhang G, Liu X, et al. Laboratory hybridization between *Crassostrea ariakensis* and *C. sikamea* [J]. Journal of Shellfish Research, 2009, 28(3):453-458.
- [19] Huo Z, Wang Z, Yan X, et al. Fertilization, survival and growth of *Crassostrea hongkongensis* ♀ × *Crassostrea ariakensis* ♂ hybrids in Northern China [J]. Journal of Shellfish Research, 2013, 32(2):377-385.
- [20] Zhang Y, Wang Z, Yan X, et al. Laboratory hybridization between two oyster species, *Crassostrea gigas* and *Crassostrea hongkongensis* [J]. Journal of Shellfish Research, 2012, 31(3):619-625.
- [21] Zhang Y, Zhang Y, Wang Z, et al. Phenotypic trait analysis of diploid and triploid hybrids from female *Crassostrea hongkongensis* × male *C. gigas* [J]. Aquaculture, 2014, 434(10):307-314.
- [22] Chevassus B. Hybridization in fish [J]. Aquaculture, 1983, 33(1-4):245-262.
- [23] Palumbi S R. Marine speciation on a small planet [J]. Trends in Ecology & Evolution, 1992, 7(4):114-118.
- [24] Gaffney P M, Allen S K. Hybridization among *Crassostrea* species: A review [J]. Aquaculture, 1993, 116(1):1-13.

Analysis of gamete compatibility and zygote fertility for *Crassostrea angulata* and *Crassostrea sikamea*

SU Jiaqi¹, WANG Zhaoping^{1*}, ZHANG Yuehuan², YU Ziniu², LI Qiongzheng³, YAN Xiwu⁴

(1. Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Fisheries College, Ocean University of China, Qingdao 266071, China;

2. Key Laboratory of Tropical Marine Biological Resources and Ecology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China;

3. Key Laboratory of Mariculture, Guangxi Academy of Fishery Science, Nanning 530021, China;

4. Engineering Research Center of Shellfish Culture and Breeding of Liaoning Province, College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China)

Abstract: To evaluate the gamete compatibility and zygote fertility between *Crassostrea angulata* and *C. sikamea*, the fertilization rate and hatching rate of two oysters at different temperature (18, 21, 24, 27 and 30 °C) and salinity (16, 20, 24, 28 and 32) were studied, and then the F_{50} critical values were determined under the different sperm concentration. Results clearly demonstrate that hybridization between *C. angulata* and *C. sikamea* is achievable in one direction due to asymmetric gamete compatibility. Fertilization and hatching level of SS, AA and SA was raised with temperature increasing, while these max values were severally 99.1% ± 0.3%, 98.4% ± 1.2% and 81.3% ± 2.8% for fertilization rate, and 99.1% ± 0.5%, 96.8% ± 2.8% and 67.1% ± 5.5% for hatching rate at 27 °C, respectively. Fertilization rate and hatching rate of SS, AA and SA at a salinity of 24 were severally 98.8% ± 1.3%, 94.8% ± 4.5%, 81.1% ± 7.4% and 75.9% ± 3.7%, 86.4% ± 4.2%, 66.1% ± 4.5%, respectively. Fertilization rate and hatching rate of SS, AA and SA at sperm concentration of 10³ ind./μL were severally 92.5% ± 2.2%, 87.2% ± 5.7%, 92.4% ± 1.2%, and 79.8% ± 4.3%, 78.9% ± 7.8%, 82.2% ± 7.0% at temperature of 27 °C and a salinity of 24, respectively. The F_{50} critical values of gamete compatibility and zygote fertility were calculated, and were 58.88 ind./μL and 208.93 ind./μL, respectively. This study provided the theory and practice for reproductive isolation mechanism and interspecific hybridization between *C. angulata* and *C. sikamea*.

Key words: *Crassostrea angulata*; *Crassostrea sikamea*; gamete compatibility; zygote fertility; reproductive isolation

Corresponding author: WANG Zhaoping. E-mail: zpwang@ouc.edu.cn