

平鲷♀ 与真鲷 ♂ 的杂交研究

江世贵¹ 李加儿¹ 区又君¹ 钟创光² 喻达辉¹

(¹ 中国水产科学研究院南海水产研究所 广州 510300)

(² 中山大学生物系 广州 510275)

提要 研究了不同盐度、温度、pH 对平鲷 *Rhabdosargus sarba* (Forsk.) ♀ 和真鲷 *Pagrosomus major* (Temminck et Schlegel) ♂ 精子活力的影响, 确立了人工授精与孵化的条件参数。平鲷♀ 与真鲷 ♂ 杂交的受精率达 95 % 以上, 胚胎发育与其亲本的相似。经过超低温保存的真鲷精子的激活率、活力与鲜精的接近, 其杂交的受精率也可达 95 % 以上。实验获得了杂交仔鱼, 但杂交的孵化率比对照组低。

关键词 杂交, 平鲷, 真鲷, 精子活力, 超低温保存, 胚胎发育

作者近来进行了平鲷 *Rhabdosargus sarba* (Forsk.) ♀ 和真鲷 *Pagrosomus major* (Temminck et Schlegel) ♂ 的杂交研究, 使用真鲷的新鲜精子和经过超低温保存的精子均获得了杂交仔鱼。这一研究是国内鲷科鱼类杂交育种的有益尝试。

1 材料与方法

1.1 亲鱼来源及其培育

实验在南海水产研究所深圳海水养殖基地进行。真鲷亲鱼来自大亚湾, 体重 1~4 kg; 平鲷亲鱼来自大鹏湾的养殖网箱, 体重 0.3 kg 以上。在繁殖季节, 挑选较成熟的亲鱼在实验室内饲养, 养殖水体 1~4 m³, 每天投喂鲮鱼 2 次, 及时排换水, 海水盐度 30~32, pH 8.0~8.2, 水温 15.5℃~20℃。

1.2 配子获取

挑选成熟的平鲷和真鲷雄鱼, 不经催产直接挤出精液, 注意避免精子激活或被粪便污染。取少许精液用海水激活, 精子激活率在 80 % 以上者用于人工授精或超低温保存。观察盐度、温度、pH 等环境因子对精子活力的影响, 精子活力用涡动时间和总活动时间表示^[4]。

成熟度好的平鲷雌鱼不经催产直接挤出卵子; 不够成熟的雌鱼可用绒毛膜促性腺激素 (HCG) 和黄体素释放激素类似物 (LRH-A) 人工催产^[3]。

1.3 真鲷精子超低温保存

将精液样品与稀释液、抗冻剂按 0.10: 0.75: 0.15 的比例(体积比)混合。稀释液有三种, 分别为 1.0 % 氯化钠溶液、3.0 % 柠檬酸钠溶液和 5.0 % 葡萄糖溶液, 抗冻剂为二甲亚砜(DMSO)。

收稿日期: 1996 年 7 月 1 日

样品混合后置于液氮(- 196 ℃)中保存,冷冻降温速率为 65 ℃/m in~ 75 ℃/m in。样品从液氮中取出后,放在 30 ℃~ 32 ℃的水浴中解冻,平均解冻速率为 40 ℃/m in~ 50 ℃/m in。样品解冻后测定精子的激活率与活力,然后用于人工授精。

1.4 人工授精及胚胎发育观察

将精液样品(每组约 1.5 m l)放入烧杯,与刚挤出的平鲷卵子(每组 1 000 粒左右)混合,半干法人工授精^[5]。10 m in 后洗卵,受精卵在 10 000 m l 的孵化缸中充气孵化。孵化时海水盐度 30, pH 8.1,孵化水温 18 ℃。在显微镜下观察胚胎发育^[1, 2, 5, 6]①,计算不同发育阶段的成活率。受精率以发育至原肠期的成活率表示。

2 结果与讨论

2.1 精子活力与人工授精条件

2.1.1 盐度对平鲷和真鲷精子活力的影响 平鲷精子在盐度 20~ 30 时活力较好(图 1),图 1 显示,当盐度为 22 时,平鲷精子的涡动时间与总活动时间均最长。统计分析表明,当盐度为 25 时,平鲷精子的涡动时间最长。真鲷精子在盐度 25~ 30 时活力较好(图 1),图 1 显示,在盐度为 30 时精子涡动时间最长,在盐度为 25 时精子总活动时间最长。

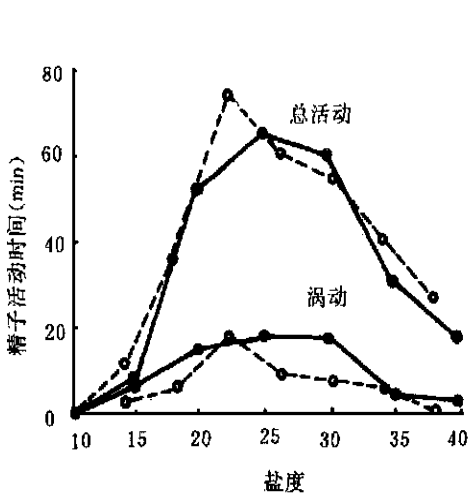


图 1 盐度对平鲷和真鲷精子活力的影响
Fig. 1 Effect of salinity on motility of silver bream and red bream spermatozoa
○.....○ 平鲷; ●——● 真鲷

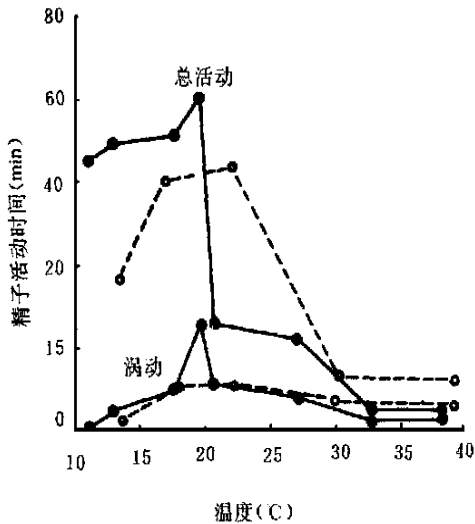


图 2 温度对平鲷和真鲷精子活力的影响
Fig. 2 Effect of temperature on motility of silver bream and red bream spermatozoa
○.....○ 平鲷; ●——● 真鲷

2.1.2 pH 对平鲷和真鲷精子活力的影响 在 pH 7.6~ 9.0 范围内,平鲷精子均具有较好的活力,但以 pH 8.2 时的活力为最好。在 pH 6.4~ 9.6 范围内,真鲷精子也都具有较好的活力。这一结果说明,平鲷和真鲷精子在激活或人工授精时,对水环境的 pH 没有十分严格的要求。

① 蔡兴邦等,1982。江苏省海洋水产研究所报告。1~ 18。

2.1.3 温度对平鲷和真鲷精子活力的影响 在 15℃~20.2℃ 水温范围, 平鲷精子活力呈上升趋势; 高于 20.2℃ 之后, 平鲷精子的活力下降(图 3)。真鲷精子在 18.8℃ 时活力最好; 随着温度的继续升高, 其活力迅速下降; 当温度低于 18.8℃ 时, 精子活动时间缩短, 但总活动时间仍较长(图 2)。

2.1.4 平鲷与真鲷杂交的人工授精条件 测定精子在不同环境中的活力, 确立活力最高时的条件参数, 是开展人工授精和杂交的前提。精子活力是影响人工授精的重要因子, 活力最好时的条件参数可视为人工授精所需的最佳条件参数。根据平鲷和真鲷的精子在不同环境中的活力, 同时考虑到以真鲷作为杂交的父本, 因此将平鲷♀ × 真鲷♂ 的人工授精条件确定为海水盐度 30、pH 8.1、水温 18℃。

2.2 杂交

使用平鲷精子(对照组)和真鲷精子分别与同一尾平鲷的同批卵子人工授精, 二者的受精卵在相同的孵化条件下, 发育至原肠期时测得的受精率几乎相同, 均在 95% 以上。在原肠期以前, 杂交组的胚胎发育与对照组几乎没有区别; 但在原肠期之后, 杂交组的胚胎发育情况比对照组差, 到胚体形成期时杂交组的成活率已明显低于对照组, 杂交的孵化率也低于对照组(表 1)。

表 1 平鲷♀ × 真鲷♂ 的受精率和孵化率

Tab. 1 The fertility rate and hatching rate in hybridization of *R. sarba* ♀ × *P. major* ♂

组别	精子激活率(%)		发育阶段(%)		孵化率 (%)
	平鲷	真鲷	原肠期	胚体形成期	
对照(平鲷♀ × 平鲷♂)	≥90		97	46	30
杂交(平鲷♀ × 真鲷♂)		≥90	98	38	25

实验结果及文献资料^[10~12]表明, 鲷科鱼类种间杂交可以获得较高的受精率。这些结果揭示了多种鲷科鱼类在受精生物学特征上的相似性, 说明了建立多种杂交组合的可能性。

在同科异种的海水鱼间进行杂交育种实验, 其杂交的成功程度取决于精、卵的亲合能力和精、卵的最佳质量。在杂交组合已经确定的前提下, 杂交育苗的成功与否主要取决于两种亲鱼的生殖期的选择, 即生殖的初~中(盛)~末期的选择。大亚湾的真鲷种群的繁殖季节为 12 月至次年 2 月, 华南沿海的平鲷种群的繁殖季节为 12 月底至次年 3 月。在这一实验中, 因前期进行精子生物学特性及精子保存研究, 育苗实验安排在 2 月底~3 月初进行, 因此, 杂交时间的安排有欠妥当。在实验时, 因已进行精子活力检测, 且保证了足够的用量, 因此, 在孵化条件适宜的情况下, 对照组的孵化率偏低, 说明卵子质量欠佳。在后续研究中应对此予以重视。与此同时, 杂交组的孵化率低于对照组, 这一现象可归因于种质的不亲合性。此外, 作者因材料所限, 未能进行反交实验, 反交能否提高孵化率及仔鱼成活率, 还需进一步研究。由于国内在鲷科鱼类人工育苗方面近几年才取得突破, 刚刚具备开展杂交育种的条件, 这一实验仅仅是国内鲷科鱼类杂交育种的开端, 许多问题都有待于深入研究。

2.3 真鲷精子超低温保存技术在杂交中的应用

2.3.1 冻精激活率与活力 真鲷精子在液氮中保存 209 d 后解冻, 其激活率高达 90% 以上, 平均达 70%~80%。在 25℃ 条件下用盐度 30、pH 8.1 的海水激活, 均有较好的活力(表 2)。因该批样品解冻时非繁殖期, 未能进行受精率测定。

表 2 真鲷精子超低温保存后的激活率与活力

Tab. 2 Motile percentage and motility of cryopreserved spermatozoa of red bream

样品	稀释液	激活率 (%)	涡动 时间 (min)	总活动 时间 (min)
鲜精		90	18	65
冻精-1	1.0 % 氯化钠溶液	80	11	70
冻精-2	3.0 % 柠檬酸钠溶液	70	15	56
冻精-3	5.0 % 葡萄糖溶液	80	18	63

表 3 精子超低温保存对平鲷♀ × 真鲷♂的杂交卵的胚胎发育的影响

Tab. 3 Effect of spermatozoa cryopreservation on embryonic development of *R. sarba* ♀ × *P. major* ♂

精液样品	稀释液	发育阶段 原肠期 胚体形成	孵化率 (%)
鲜精(对照)		98 38	25
冻精-1	1.0 % 氯化钠溶液	96 35	19
冻精-2	3.0 % 柠檬酸钠溶液	96 29	0
冻精-3	5.0 % 葡萄糖溶液	97 31	6

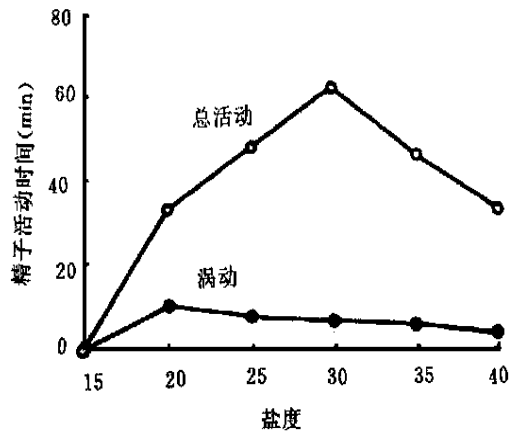


图 3 盐度对真鲷冻精活力的影响

Fig. 3 Effect of salinity on motility of cryopreserved spermatozoa of red bream

解冻后的真鲷精子在不同盐度中的活力与新鲜精子略有不同,活力变化规律也有区别(图 3),在盐度 20 时的涡动时间最长,在

盐度 30 时的总活动时间最长。此外,解冻后精子激活所需的最低盐度高于激活鲜精所需的最低盐度,前者为盐度 15 以上,后者为盐度 10 以上,这一结果表明,超低温保存过程使真鲷精子的渗透压升高。保存后的真鲷精子在 pH 6.4~9.6 范围内,其活力均好,这一结果与鲜精的相似,但当 pH 低于 6.8 或高于 8.8 时,精子的总活动时间明显缩短。

2.3.2 冻精杂交 真鲷精子在液氮中保存 20 d 后解冻,与平鲷卵子杂交,其受精率与对照组接近,孵化率较对照组低(表 3)。这一结果表明,真鲷精子超低温保存对杂交的受精率没有影响,但会影响杂交受精卵的孵化率。影响冻精杂交的孵化率的原因,将在胚胎发育部分予以讨论。使用超低温保存的精子人工授精,进行受精率的测定,是检测冻精质量的方法之一,因而关于冻精受精率的报道很多^[7,9]。但迄今关于鱼类冻精杂交的报道却很少^[8,12],就鲷科鱼类而言,目前仅有 Kurokura 等^[12]用日本犁齿鲷 *Evynnis japonica* Tanaka 的冻精与真鲷卵子杂交,获得较高的受精率和孵化率。从上述的实验结果看到,真鲷精子经过超低温保存后,不仅具有较高的激活率与活力,也能获得较高的杂交受精率,并能孵化出仔鱼。这一结果表明,真鲷精子超低温保存技术应用于鲷科鱼类杂交育种是完全可行的。

2.4 胚胎发育

平鲷♀ × 真鲷♂的受精卵的胚胎发育历期与平鲷、真鲷的胚胎发育历期没有显著区别。当孵化温度为 18 ℃ 时,平鲷、真鲷的孵化时间分别为 60 h, 66 h^①,平鲷♀ × 真鲷♂杂交受精卵的孵化时间与其亲本的相近,为 62.5 h。在显微镜下观察,各发育阶段的形态特征也与其亲本的相似^[1,5,6],故不再详述(表 4)。

蔡兴邦,1982. 江苏省海洋水产研究所报告。1~18。

表 4 平鲷♀ × 真鲷 ♂ 的受精卵的胚胎发育(水温 18℃)

发育阶段	时间 (时:分)	形态、特征简述
受精卵	0	卵吸水膨胀,出现围卵周隙
胚盘隆起	0:40	原生质集中于动物极,形成帽状胚盘
2 细胞	1:40	第一次分裂
4 细胞	2:30	第二次分裂
8 细胞	3:10	第三次分裂
16 细胞	3:55	第四次分裂
高囊胚	5:05	囊胚呈高帽状
低囊胚	10:10	囊胚呈扁平状,分裂球较小
原肠期	17:10	胚环开始下包
胚体形成	26:55	胚环下包卵黄 2/3, 头部明显
卵化	62:25	仔鱼破膜而出

受精卵的胚胎发育受到精卵质量、孵化条件等因子的影响。杂交对精、卵质量的要求更高。在使用鲜精杂交时,精子皆经过活力检测,且使用过量(相对于正常育苗时的精卵比例而言),保证了精子的质量和数量,所以实验结果反映不出精子质量对杂交受精卵胚胎发育的影响。但在冻精杂交实验中,由于经过超低温保存的精子受到一定程度的冷冻损伤,所以,冻精杂交后的胚胎发育比对照组(鲜精杂交)的差,这从一个侧面反映出精子质量对杂交的胚胎发育的影响。精子冷冻损伤是冻精杂交孵化率低的原因之一。

当卵子质量较差时(对照组的受精率低于 30%),杂交组的胚胎发育在卵裂开始后陆续停滞,不能完成孵化过程。

温度、盐度等孵化条件通常是影响孵化时间和孵化率的重要因子。平鲷和真鲷在胚胎发育时,水温过高或过低都会导致孵化率的降低,同时,在一定温度范围内,水温越高孵化时间越短^[3,5]。真鲷产卵环境的盐度为 29~34^[5],平鲷胚胎发育的最适盐度为 30^[3]。因此,在实验中采用盐度 30, pH 8.1 的孵化条件,对杂交受精卵的发育是适宜的。对于孵化温度,则还可适当提高,以缩短孵化时间。

另外,在杂交授精后,洗卵是一个必不可少的步骤。尤其在进行冻精杂交时,若不将冻精中所含的 DMSO 洗净,就会影响孵化。实验发现,当孵化水中的 DM SO 达到一定浓度,受精卵的胚胎发育即陆续停滞,不能完成孵化过程。因此,上述冻精杂交的孵化率比鲜精杂交的孵化率低,也许与 DMSO 的残留有关。

参考文献

[1] 郑镇安等,1983. 福建水产 3: 3~ 16。
[2] 郑运通等,1986. 海洋渔业 8: 205~ 208。
[3] 马荣和等,1989. 南海水产研究文集. 广东科技出版社,1~ 8。
[4] 区又君、李加儿,1991. 中国水产科学研究院学报 4: 18~ 26。
[5] 赵传 等,1985. 中国近海鱼卵与仔鱼. 上海科学技术出版社。
[6] 周宏团等,1990. 水产科技情报 1: 2~ 5。
[7] 张轩杰,1987. 水产学报 9: 259~ 267。
[8] 张轩杰,1987. 湖南师大学报 10: 59~ 64。
[9] 陈松林等,1992. 水产学报 16: 337~ 345。
[10] 原田辉雄,1974. 养殖 11: 50~ 54。
[11] Chiraka K. and Yasuo T., 1983. Japan. J. Ichthyol. 30: 275-283。
[12] Kurokura, H. et al., 1986. Proc. First Asian Fish Forum. Manila, Philippines, 113-116。

STUDIES ON HYBRIDIZATION BETWEEN FEMALE SILVER BREAM *Rhabdosargus sarba* AND MALE RED BREAM *Pagrosomus major*

Jiang Shigui¹, Li Jiaer¹, Ou Youjun¹, Zhong Chuanguang² and Yu Dahui¹

(¹South China Sea Fish, Institute, CAFS, Guangzhou, 510300)

(²Biology Department, Zhongshan University, Guangzhou, 510275)

Received: Jul. 1, 1996

Key Words: Hybridization, Silver bream, Red bream, Spermatozoal, Motility, Cryopreservation, Embryonic development

Abstract

According to the spermatozoal motility of silver bream *Rhabdosargus sarba* (Forsk.) and red bream *Pagrosomus major* (Temminck et Schlegel) under different environmental conditions, the condition parameters that affected insemination and hybrid hatching were optimized. The parameters included salinity, pH, and temperature. The hybridization between female silver bream and male red bream was carried out, its fertility rate was over 95 %, and the embryonic development of the hybrid was similar to its parents'. The motility of the cryopreserved spermatozoa of red bream was almost as good as controls (fresh spermatozoa), and the post-thaw spermatozoa were also used for the hybridization, with the fertility rates all over 95 %. The hybrid larvae were obtained in these experiments. The hatching rate should be improved in this hybridized combination.