



## 三疣梭子蟹受精卵离体孵化技术

牛雪莹<sup>1</sup>, 任志明<sup>2</sup>, 吴佳颖<sup>1</sup>, 母昌考<sup>1\*</sup>, 王春琳<sup>1</sup>

(1. 宁波大学海洋学院, 水产生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315211;

2. 宁波大学机械工程与力学学院, 浙江 宁波 315211)

**摘要:** 为了探究三疣梭子蟹受精卵的离体孵化技术及效果, 本研究先后开展了受精卵块最适分离液种类及作用条件的筛选、分离液处理不同发育期受精卵离体孵化的差异、分离液处理对受精卵卵膜的结构影响, 及分离液处理受精卵对孵化后幼体活力的影响实验。结果显示, 木瓜蛋白酶是一种较为理想的分离液, 在浓度为 0.09 g/mL, 分离时间 30 min 时, 分离率可达到 99% 以上; 经过分离液处理后的各期受精卵均能孵化出幼体, 卵内蚤状幼体期离体胚胎孵化率最高, 为 89.0%±3.3%, 未经处理的对照组为 70.0%±4.8%; 卵裂期离体胚胎孵化率最低, 为 58.0%±3.9%, 对照组为 31.0%±2.3%, 与对照组相比, 处理组的孵化率明显提高。透射电镜结果显示, 经过分离液处理的受精卵卵膜结构疏松, 且厚度降低, 符合处理组孵化率增加这一现象, 干露、福尔马林溶液胁迫和行为学测试对不同处理组的幼体进行质量评价的结果显示, 处理组和对照组幼体活力无显著差异。研究表明, 实验所获得的分离液可以有效提高三疣梭子蟹受精卵的分离率和孵化率, 且不影响幼体质量, 可为三疣梭子蟹及其他甲壳动物受精卵的离体孵化提供参考。本研究可为三疣梭子蟹的苗种繁育提供新的技术手段, 也将为基因编辑辅助育种等技术的实施奠定基础。

**关键词:** 三疣梭子蟹; 离体孵化; 孵化率; 幼体活力

**中图分类号:** S 968.25\*2

**文献标志码:** A

三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 是一种重要的海洋经济甲壳类动物, 广泛分布于印度洋和西太平洋沿海水域<sup>[1]</sup>, 其肉质鲜美、营养丰富, 深受大众喜爱, 是中国沿海地区的特色海鲜<sup>[2]</sup>。2020 年全国梭子蟹养殖产量达到 10.09 万 t, 全国海洋捕捞产量 42.46 万 t, 全国海水养殖面积 20 671 hm<sup>2</sup>, 产量和养殖面积均比 2019 年有所下降<sup>[3]</sup>, 养殖技术急需改进。优质的苗种是养殖成功的关键, 而三疣梭子蟹苗种的培育受多种病害的制约<sup>[4]</sup>, 如弧菌病、固着类纤毛虫病、发光病, 黑鳃病和蜕壳障碍病等<sup>[5]</sup> 都会在三疣梭子蟹幼体培

育阶段产生严重危害。现有育苗生产过程, 都是将抱卵蟹(携带受精卵的亲体)直接放入育苗池进行幼体孵化, 这种操作方式会导致极高的污染率, 以上病原生物大部分是由抱卵蟹直接接触育苗水体及初孵幼体(Z<sub>1</sub>)进行传播的。

胚胎离体培养技术将受精卵和亲体分离, 能够有效避免来自亲体病原生物感染幼体的风险, 但是关于甲壳动物胚胎离体孵化的研究进展缓慢。Cheng 等<sup>[6]</sup>发现, 如果采用合理的消毒、SPF 检测和病原分离方法, 利用最佳的卵密度和孵化体系, 就可以实现红螯光壳螯虾 (*Cherax quadricarinatus*)

收稿日期: 2021-11-26 修回日期: 2022-04-09

资助项目: 国家自然科学基金(42076087)

第一作者: 牛雪莹(照片), 从事海水蟹人工繁育研究, E-mail: 531413739@qq.com

通信作者: 母昌考, 从事虾蟹养殖技术研究, E-mail: muchangkao@nbu.edu.cn



的规模化离体生产。但离体孵化的效果往往与胚胎离体的时间呈负相关<sup>[7]</sup>。本研究以孵化率、孵化时间和幼体活力为评价指标, 开展三疣梭子蟹离体孵化技术研究, 可为三疣梭子蟹的苗种繁育提供新的技术手段, 也将为基因编辑辅助育种等技术的实施奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验蟹饲养与管理

本研究中三疣梭子蟹亲体 (260±50) g 来自宁波市奉化区臭皮匠水产养殖场, 挑选附肢健全, 活力好, 无机械损伤的亲蟹暂养于宁波大学海洋学院中试基地, 采用帆布池作为培育池 (长 1.5 m, 宽 1.0 m, 高 0.6 m), 占池底面 1/2 位置铺上厚 15 cm 经过消毒处理的海沙作为栖息区; 其余 1/2 作为投饵与亲蟹摄食区, 水位 40 cm, 日换水 50%。亲蟹的饵料主要是活沙蚕, 每日换水后投饵料, 日投饵量为亲蟹总体重的 10%~15%。实验过程中操作人员严格遵守实验动物福利伦理规范。

### 1.2 实验设计

**最适受精卵块分离液的筛选** 亲蟹抱卵后, 用无菌手术剪从亲蟹腹部剪下受精卵约 3 000 颗, 用消毒海水清洗 3 遍后, 在消毒海水中充气暂养 8 h, 再进行分离实验。实验设置 4 个酶液处理组, 分别为中性蛋白酶、碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶和混合酶液 (中性蛋白酶: 碱性蛋白酶: 木瓜蛋白酶 = 1: 1: 1, 体积比)。酶液均由消毒海水配制, 每组设置 3 个平行, 每个平行放入成串的受精卵 (200±20) 颗, 将受精卵和不同浓度的酶液放入一次性培养皿中, 置于 25 °C 摇床中, 转速 40 r/min。第一步, 以酶浓度 0.03 g/mL, 处理 2 h 后测定分离率 (分离率=单粒状态受精卵数/受精卵总数), 依据分离率筛选出最适酶液种类。第二步, 选取最适酶液种类, 均设置 3 个浓度梯度: 0.03、0.06 和 0.09 g/mL, 处理 2 h 后测定分离率, 依据分离率筛选出最适酶液浓度。第三步, 选取最适酶液种类, 在最适作用浓度下, 进行最适处理时间的测定。最终确定最适分离液的种类及处理条件。

**透射电镜观察分离液作用后卵膜的变化**

实验分组三组, 以没有处理过的受精卵作为对照组, 处理组 1 为 0.09 g/mL 木瓜蛋白酶作用 30 min 的受精卵, 处理组 2 为 0.09 g/mL 混合酶液作用 30 min 的受精卵。采集样品后立刻用戊二醛进行固定, 然后用常规方法制备电镜超薄切片 (Lee

HT, 2009), 用日立透射电镜 (H-7650) 型透射电子显微镜, 对超薄切片进行观察, 对卵细胞结构拍照, 着重观察卵膜结构。

**不同时期受精卵离体孵化情况** 亲蟹抱卵后, 剪取卵裂期、囊胚期、原肠胚、卵内无节幼体期、卵内溞状幼体期的受精卵置于已筛选的最佳分离液中进行处理。用消毒海水冲洗 5 次后, 将分离后的单粒受精卵放入离体孵化装置。每天换水 1 次, 海水经 0.22 μm 滤膜过滤后使用, 控制 pH 在 8.0~8.5, 水温 25~26 °C, 盐度为 25, 溶解氧含量为 8 mg/L, 光环境为室内自然光照, 每组实验重复 3 次。

**幼体活力测试** ①干露耐受力测试, 从离体孵化器 (原肠期) 和亲蟹育苗池中随机选取 I 期溞状幼体, 置于垫有吸水纸的 100 目筛绢上。设置时间间隔为 5、10、15、20 和 25 min。每个时间间隔组取 10 只 I 期溞状幼体, 设置 3 个平行。干露结束后, 立即将幼体放入盛有消毒海水的烧杯内, 对强光没有反应的幼体可判定其死亡, 随后观察并记录存活率。实验分组包括对照组 (不经分离液处理卵巢孵化幼体)、0.09 g/L 木瓜蛋白酶组、0.09 g/L 混合酶液组和母体孵化组。

②福尔马林耐受测试, 从离体孵化器 (原肠期) 和亲蟹育苗池中随机取 10 只 I 期溞状幼体, 分别放入 100 mL 的烧杯中, 设福尔马林分为 30、40、50、60 和 70 mg/L 共 5 个浓度梯度 (使用质量分数为 40% 的甲醛配置), 每个浓度组取 10 只 I 期溞状幼体, 设置 3 个平行, 3 h 后观察幼体的活动以及存活情况。实验分组同干露耐受力测试。

③行为学观察, 从离体孵化器和亲蟹育苗池中各随机取 10 只 I 期溞状幼体置于行为拍摄室内拍摄观察 (全暗)。行为拍摄室为一个全部遮黑玻璃缸 (长 10 cm×宽 3 cm×高 12 cm), 在缸的顶部正中央放置光源, 缸的正前方放置拍摄相机, 缸后垂直放置 1 cm×1 cm 的刻度板。

针对获取的视频进行分析统计, 记录以下行为参数。趋光响应时间 (s): 开灯瞬间到幼体开始游动的时间。运动速度 (cm/min): 幼体游向光源的速度。运动距离 (cm): 幼体游向光源的路径长度。

### 1.3 数据分析

所有的实验数据均以平均值±标准误 ( $n=3$ ) 表示, 用 Levene 氏法确定是否符合正态分布和方差齐性, 之后再采用 SPSS 22.0 软件对所有数据进行双因素方差分析 (Two-Way ANOVA), 若存在

显著差异, 则用 Tukey 氏检验对数据进行多重比较分析, 当  $P < 0.05$  时, 则认为组间在统计学上具有显著差异。使用 GraphPad Prism 8.0.2 软件 (美国) 进行图形处理。

## 2 结果

### 2.1 不同分离液及其浓度对受精卵块的分离效果

设定酶液作用时间为 2 h, 随着浓度的增加, 不同处理组的分离率均有所提升, 组间分离率存在显著差异。酶液浓度为 0.03 g/mL 时, 碱性蛋白酶液、中性蛋白酶液、木瓜蛋白酶液和混合酶液的分离率分别为 11.67%、23.34%、100.00% 和 100.00%。酶液浓度为 0.06 g/mL 时, 碱性蛋白酶液、中性蛋白酶液、木瓜蛋白酶液和混合酶液的分离率分别为 24.33%、36.00%、100.00% 和 100.00%; 酶液浓度为 0.09 g/mL 时, 碱性蛋白酶液、中性蛋白酶液、木瓜蛋白酶液和混合酶液的分离率分别为 55.00%、64.67%、100.00% 和 100.00% (图 1)。结果显示, 酶液处理 2 h, 木瓜蛋白酶液和混合酶液在三个浓度下分离率均可达到 100%, 将作用时

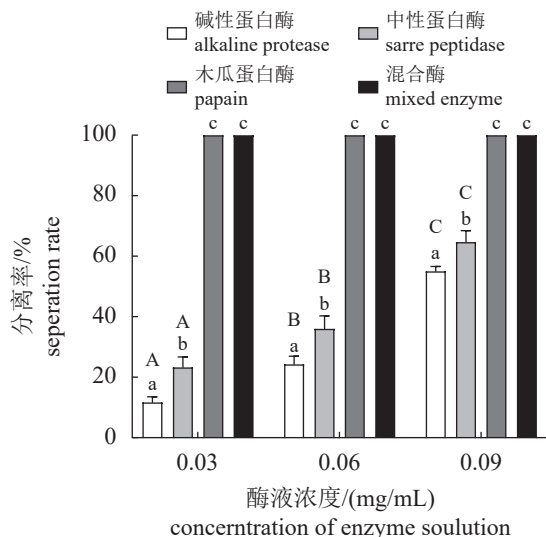


图 1 不同浓度酶液处理 2 h 的三疣梭子蟹卵块的分离率

不同小写字母表示相同酶液浓度下, 不同酶液之间卵块分离率存在显著差异 ( $P < 0.05$ ); 不同大写字母表示相同酶液在不同浓度下卵块分离率存在显著差异 ( $P < 0.05$ ), 图 2~3 同。

Fig. 1 Effect of enzyme solution treatment on separation rate of *P. trituberculatus* egg block after 2 h

Different lowercase letters indicate that under the same concentration of enzyme solution, there is significant difference in egg mass separation rate between different enzyme solutions ( $P < 0.05$ ); different capital letters indicate significant difference in egg mass separation rate under different concentrations of the same enzyme solution ( $P < 0.05$ ), the same as Figs.2-3.

间缩短至 30 min, 在 0.03、0.06 和 0.09 g/mL 的浓度下进行分离实验。结果显示, 酶液作用时间为 30 min, 浓度为 0.09 g/mL 的酶液处理组, 木瓜蛋白酶液和混合酶液的分离率也为 100% (图 2)。随后, 选取木瓜蛋白酶液和混合酶液, 酶液浓度为 0.09 g/mL, 作用时间为 30 min, 进行最适作用时间测定。结果显示时间与分离率呈正相关, 在酶液浓度为 0.09 g/mL, 作用时间为 30 min 时, 可以达到最佳的分离效果 (图 3)。

### 2.2 透射电镜观察分离液作用后卵膜的变化

透射电镜观察结果显示, 与对照组相比, 经

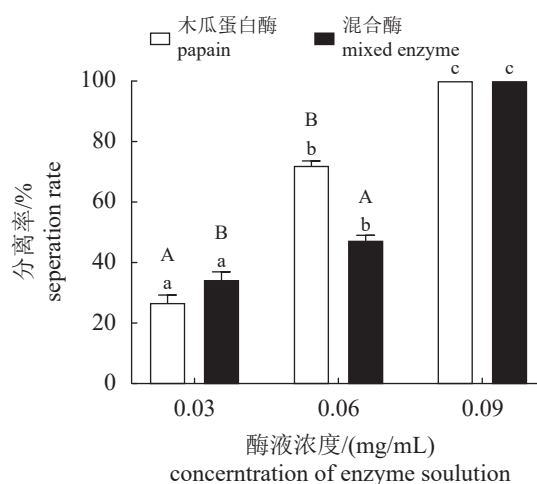


图 2 不同浓度的木瓜蛋白酶液和混合酶液处理 30 min 的三疣梭子蟹卵块的分离率

Fig. 2 Effect of enzyme solution treatment on separation rate of *P. trituberculatus* egg block after 30 min

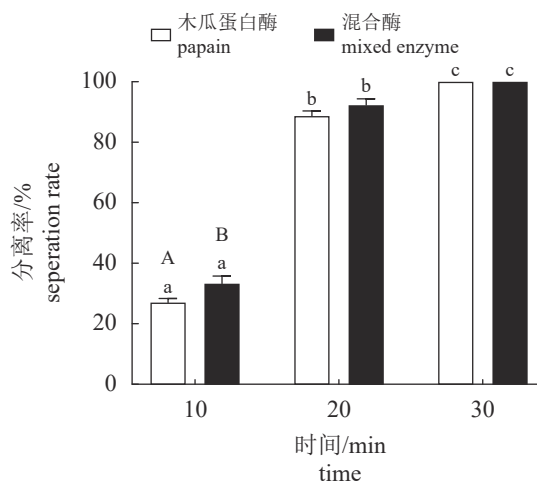


图 3 0.09 mg/L 木瓜蛋白酶液和混合酶液处理 30 min 的三疣梭子蟹卵块的分离率

Fig. 3 Effect of enzyme solution treatment on separation rate of *P. trituberculatus* egg block after 30 min

过酶液处理的受精卵的外卵膜结构稀疏, 与内卵膜出现明显的分层(图 4-a)。其中, 木瓜蛋白酶处理的受精卵的外卵膜在厚度上减少至对照组的一

半(图 4-b), 混合酶液处理的受精卵的外卵膜出现分层, 但厚度没有明显变化(图 4-c)。

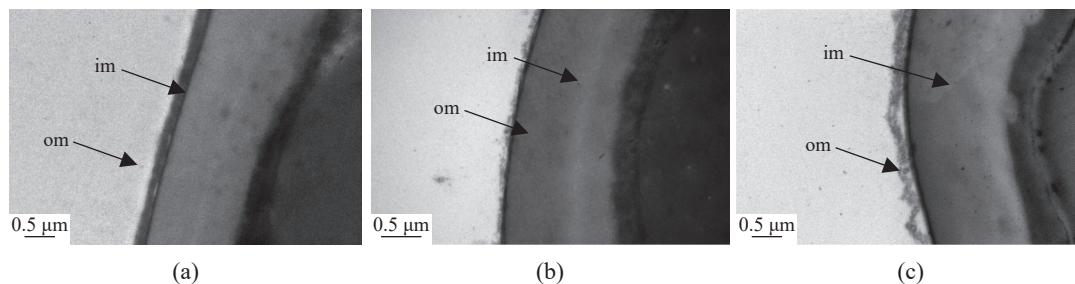


图 4 卵膜的透射电镜观察

(a) 对照组; (b) 处理组 1, 为 0.09 g/mL 木瓜蛋白酶作用 30 min 的受精卵; (c) 处理组 2, 为 0.09 g/mL 混合酶液作用 30 min 的受精卵。im, 内卵膜, om, 外卵膜。

Fig. 4 Transmission electron microscopy transverse sections of the outer egg membrane

(a) control group; (b) treatment group 1, the concentration of the papain was 0.09 g/mL and the separation time was 30 min; (c) treatment group 2, the concentration of the mixed enzyme was 0.09 g/mL and the separation time was 30 min. im, inner egg membrane, om, outer egg membrane.

### 2.3 不同发育阶段受精卵离体孵化情况

在孵化水温为  $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$  时, 不同发育时期的离体胚胎在对照组、处理组 1 与处理组 2 处理后均能孵化出幼体, 但孵化率存在显著差异(图 5)。卵裂期受精卵块的孵化率为 31%, 处理组 1 的孵化率为 58%, 处理组 2 的孵化率为 64%。囊胚期受精卵块的孵化率为 42%, 处理组 1 的孵化率为 72%, 处理组 2 的孵化率为 72%。原肠期受精卵块的孵化率为 57%, 处理组 1 的孵化率为 76%, 处理组 2 的孵化率为 75%。卵内无节幼体期受精卵块的孵化率为 59%, 处理组 1 的孵化率为 89%, 处理组 2 的孵化率为 85%。卵内蝌状幼体期受精卵块的孵化率为 70%, 处理组 1 的孵化率为 89%, 处理组 2 的孵化率为 87%。对照组受精卵块的孵化率比处理组低, 且差异显著 ( $P < 0.05$ ), 两个处理组孵化率差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 且发育期越靠后, 胚胎的孵化率越高。

### 2.4 幼体活力测定

**耐干露测试** 孵化后的幼体进行耐干露试验, 包括对照组、木瓜蛋白酶组、混合酶液组、母体孵化组, 4 个组幼体耐干露能力无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 5 min 内幼体的死亡率在 5% 以下, 15 min 后幼体死亡率显著上升(图 6), 在干露 20 min 后, 幼体全部死亡。

**福尔马林耐受测试** 幼体的存活率受福尔马林浓度的影响较为显著, 在浓度为 30 mg/L 的条件下, 幼体在 3 h 时的死亡率在 10% 以下(图 7),

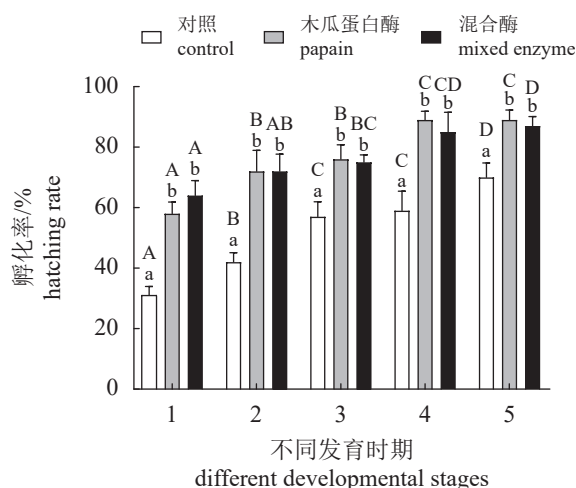


图 5 不同发育时期三疣梭子蟹胚胎的的离体孵化效果

1. 卵裂期, 2. 囊胚期, 3. 原肠期, 4. 卵内无节幼体期, 5. 卵内蝌状幼体期。不同小写字母表示相同发育时期, 不同酶液之间孵化率差异显著; 不同大写字母表示相同酶液在不同发育时期孵化率差异显著。

Fig. 5 Effects of *P. trituberculatus* embryo incubation *in vitro* at different developmental stages

1. cleavage stage, 2. blastula stage, 3. gastrula stage, 4. nauplius stage, 5. zoea stage. Different lowercase letters indicate that there are significant differences in hatching rate between different enzyme groups at the same development stage; different capital letters indicate that the hatchability of the same enzyme group is significantly different at different developmental stages.

4 个组无显著差异 ( $P > 0.05$ )。随着福尔马林浓度的升高, 幼体的死亡率显著升高。

**行为学观察** 在完全黑暗的条件下, 出现光源时, 4 个处理组的幼体响应时间没有显著差异

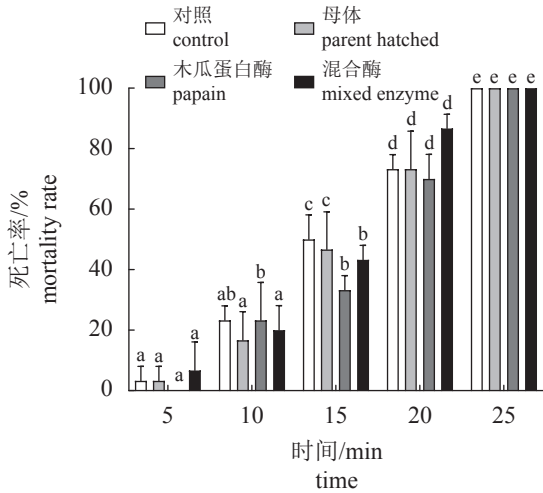


图 6 干露对三疣梭子蟹幼体死亡率的影响

不同字母表示在同组内, 不同酶液之间死亡率存在显著差异 ( $P < 0.05$ ), 图 7 同。

Fig. 6 Effects of exposure to air on the mortality rate of larval *P. trituberculatus*

Different letters indicate that in the same group, there is significant difference in mortality rate between different enzyme solutions ( $P < 0.05$ ), the same as Fig. 7.

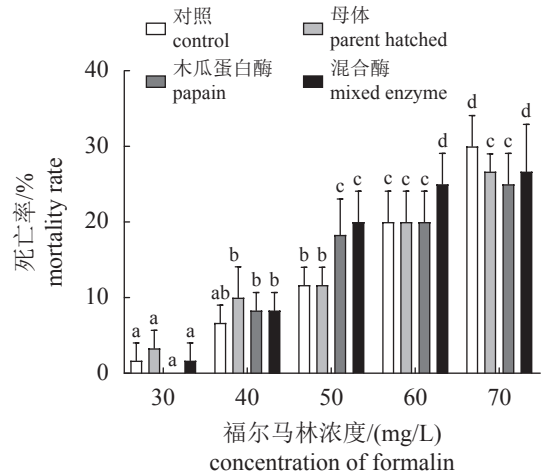


图 7 不同浓度福尔马林胁迫 3 h 后对三疣梭子蟹幼体存活率的影响

Fig. 7 Effects of formalin on the survival rate of larval *P. trituberculatus*

(图 8), 平均响应时间为 2.43 s; 平均运动距离和平均运动速度分别为 8.34 cm 和 1.65 cm/s, 均无显著差异 ( $P > 0.05$ )。

### 3 讨论

#### 3.1 不同分离液对受精卵块的分离效果

三疣梭子蟹产卵后, 受精卵通过黏液腺分泌

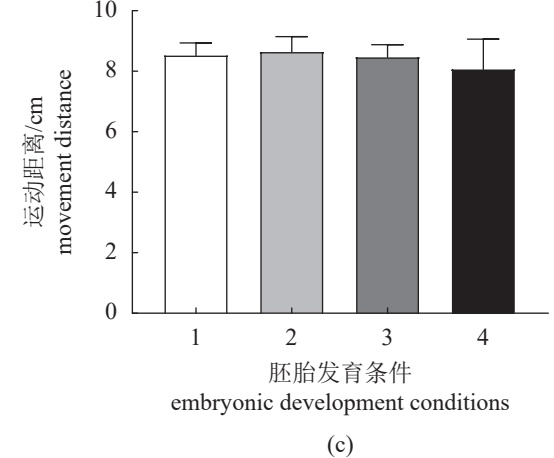
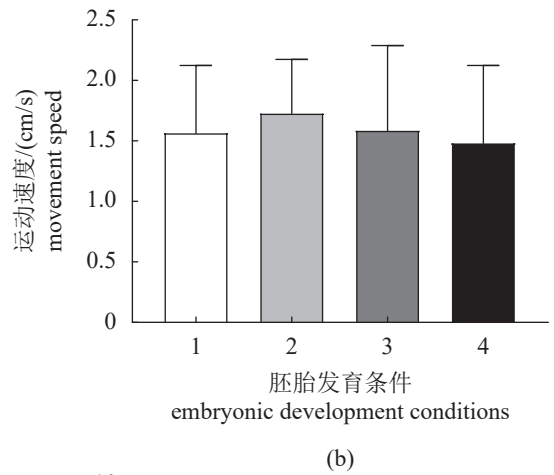
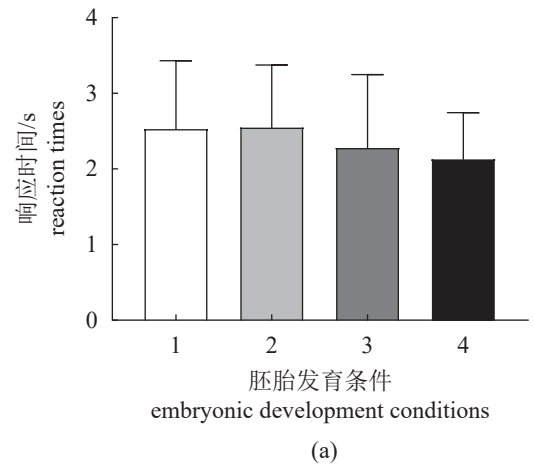


图 8 离体和母体培养条件下三疣梭子蟹幼体的行为观察

(a) 响应时间, (b) 运动速度, (c) 运动距离; 1.混合酶, 2 母体, 3. 木瓜蛋白酶, 4 对照。

Fig. 8 Observation of larval *P. trituberculatus* under the conditions of *in vitro* incubation and parental hatch

(a) reaction time, (b) speed, (c) movement distance; 1. mixed enzyme, 2. parent hatched, 3. papain, 4. control.

的黏液形成卵柄和外层卵膜, 将其固着在腹肢的刚毛上, 直到孵化<sup>[8]</sup>。但是甲壳类在离体培养时,

受精卵之间黏连的黏液会附着大量的病原生物, 例如聚缩虫<sup>[9]</sup>、丝状细菌<sup>[10]</sup>等病原体。此外, 污染和死亡的受精卵会影响到周围健康的受精卵, 有时甚至导致 100% 的死亡率<sup>[11]</sup>。所以为提高受精卵的离体孵化率, 不少研究者使用药物或者清理死卵的方式来处理。Carral 等<sup>[12]</sup>在白螯虾 (*Austropotamobius pallipes*) 的离体培养中通过定期的清理死卵, 可以有效地降低受精卵的死亡率。廖永岩等<sup>[13]</sup>则通过使用药物来提高孵化率, 使用 0.2 mg/dm<sup>3</sup> 的孔雀石绿处理远海梭子蟹 (*P. pelagicus*) 离体卵效果显著。鲍鹰等<sup>[14]</sup>在中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 胚胎离体孵化中发现, 福尔马林与孔雀石绿联用比其单独使用的效果明显。虽然使用药物处理离体胚胎取得了一定效果, 但规模化生产中将增加生产成本, 且孔雀石绿等药物已被禁用。本研究采用酶液使受精卵分离的方法, 极大地避免了连接性污染, 进而提高孵化率, 通过酶的分解作用消化了受精卵之间黏连的蛋白, 减少了受精卵黏连带来的污染。结果显示, 在时间为 30 min, 浓度为 0.09 mg/mL 时, 受精卵块的分离率最高, 可达 100%, 一定程度上减少了病原微生物造成的危害, 还避免了药物使用带来的环境污染, 为虾蟹人工育苗技术创新提供新的参考。

### 3.2 分离液作用后卵膜的变化

在许多动物中, 成熟卵子外有一层或多层被膜, 它们对受精和胚胎发育具有十分重要的作用。在中华绒螯蟹<sup>[15]</sup>、普通滨蟹 (*Carcinus meanus*)<sup>[16]</sup>、锐脊单肢虾 (*Sicyonia ingensis*)<sup>[17]</sup>、日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*)<sup>[18]</sup>、锯缘青蟹 (*Scylla serrata*) 中均观察到有两层卵黄膜组成的结构。孵化膜为胚胎提供了良好的发育环境, 一方面保护胚胎免受外界物质侵扰, 另一方面又是胚胎与外界进行物质交换的筛选膜。本研究中, 分离液处理过的受精卵孵化率增加, 进行透射电镜观察后发现, 酶液处理过的受精卵膜与对照组相比结构疏松, 且厚度减少了将近一半, 与日本绒螯蟹 (*E. japonica*)<sup>[19]</sup> 的报道一致, 去除体外人工受精卵外膜后孵化率从 10% 上升到 90% 以上, 认为卵膜的厚度能够影响受精卵的孵化率, 随后 Lee<sup>[20]</sup> 利用水的张力将卵膜的厚度减少至原来的三分之一, 正常孵化率从 10.69% 提高到 66.67%。在本研究中, 通过分离液的酶分解作用使得外卵膜的厚度变薄, 外卵膜的变薄不仅可以提高氧的交换率, 而且可以提高代谢物质的排出率, 进而提高受精

卵的孵化率。

### 3.3 不同时期受精卵离体孵化情况

本研究中, 三疣梭子蟹未分散的卵块在原肠期和原肠期之前的胚胎离体培养时期的孵化率普遍低于 50%。原肠期之后的胚胎孵化率提高到 50% 以上, 分离处理的受精卵孵化率可提高至 75% 以上。可见原肠期是离体培养的一个关键时期。在锯缘青蟹<sup>[21]</sup> 中也存在相似的现象, 青蟹在原肠期和原肠期之前的胚胎离体培养时的孵化率普遍较低而且相近, 都未超过 40%。原肠期之后的胚胎孵化率大大提高, 达到 80% 以上。并且不同步发育的胚胎一般也停滞在原肠期, 而且流产卵离体培养的胚胎死亡通常大量出现在原肠期<sup>[22]</sup>。推测原肠期是整个胚胎发育过程中的关键时期, 其间众多细胞有规律地迁移、排列和分化而形成胚层, 各胚层细胞开始分化形成各种组织和器官。此外, 原肠期胚胎内基因组也由最初的母型调控进入胚胎自身合子型调控<sup>[23]</sup>。所以, 原肠期之前, 胚胎比较脆弱, 发育处于相对不稳定时期。一旦过了原肠期, 胚胎就比较容易脱离母体而独立生存。本研究结果充分证实了这一点, 并且经过分离液处理后的受精卵, 由于减少了受精卵膜的厚度和黏连带来的污染, 孵化率在原肠期之前就突破了 50%。由此可见, 尽管原肠期的受精卵容易大量死亡, 但是将受精卵块分离之后就可以有效地避免离体孵化在原肠期的大量死亡, 提高孵化率。

### 3.4 离体孵化对幼体活力的影响

离体培养可以解决许多生产问题, 例如孵化率低、孵化不同步、抱卵蟹死亡连带造成受精卵的浪费<sup>[24]</sup> 等。离体孵化还可以更精确地控制环境条件, 可以减少由于母体的侵略性接触、疾病或死亡而造成的损失<sup>[25]</sup>, 此外, 离体孵化节省空间和成本, 可以提高生产效益。但是可能会产生一个问题, 离体条件下孵化的幼体与母体孵化的幼体质量有无差异。胁迫实验发现, 经过分离液处理后, 离体孵化的幼体与母体孵化的幼体没有显著差异。陆家平等<sup>[26]</sup> 认为虾苗包埋于拧干的湿毛巾中 5 min, 取出放回原育苗池水中, 成活率无影响的即为优质虾苗。在本研究中, 刚孵化的幼体在干露 5 min 时死亡率在 10% 以下, 随着干露时间的增加, 死亡率逐渐上升, 以 15 min 为节点, 死亡率达 50% 以上, 这与斑节对虾的实验结果基

本一致<sup>[27]</sup>。Quinitio 等<sup>[28]</sup>把福尔马林的耐受性作为一种评判拟穴青蟹 (*S. serrata*) 幼体活力的指标, 在 40 mg/L 的福尔马林中胁迫暴露 3 h, 如果  $Z_1$  在 3 h 内的死亡率仅在 0%~8%, 则该批幼体质量较好, 如果死亡率为 >38%, 则其质量较差, 育苗可在  $Z_1$  时期终止。本研究中, 离体孵化与亲体抱卵孵化幼体的福尔马林耐受性无显著差异, 初步说明离体孵化不影响幼体质量。

另外, 对于水产动物的生存(生活)状态, 能够从行为学和生理学两个方面进行评估、监测和衡量, 相比利用生理学的方法, 使用行为学方法的实用性和可操作性更强, 并且行为学的方法作为一种非侵入性的技术手段, 几乎不会对水产动物造成伤害, 同时更为直观, 能在较短的时间内作出定性和定量的判断<sup>[29]</sup>。在动物的各种行为活动中, 运动作为水产动物最基本的行为, 是其他行为发生的基础<sup>[30]</sup>。所以为进一步比较离体和亲体抱卵条件下幼体活力的差异, 本研究选取响应时间、运动速度和运动距离 3 个参数对离体孵化幼体的行为进行了分析, 结果显示离体和亲体抱卵条件下孵化的幼体运动能力差异不显著, 再次证明离体培养是可行的。

综上, 本研究确定了三疣梭子蟹受精卵块合适的分离液配方及处理方法, 即 0.09 g/mL 的木瓜蛋白酶, 分离时间 30 min, 明确了三疣梭子蟹各阶段胚胎均能够离体孵化出幼体, 并且其与亲体孵化方式所孵出幼体活力无显著差异, 表明本研究所采用的胚胎离体孵化方法对幼体质量无负面影响。因此, 该受精卵酶法分离与离体培养技术可进一步开发完善, 作为三疣梭子蟹受精卵培养和幼体孵化的全新技术方法, 为三疣梭子蟹及其他甲壳动物受精卵的离体孵化提供参考。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

## 参考文献 (References):

- [1] Yuan Y, Wang X X, Jin M, *et al.* Modification of nutritional values and flavor qualities of muscle of swimming crab (*Portunus trituberculatus*): application of a dietary lipid nutrition strategy[J]. *Food Chemistry*, 2020, 308: 125607.
- [2] Sun P, Jin M, Ding L Y, *et al.* Effect of dietary soybean lecithin and cholesterol on growth, antioxidant status and fatty acid composition of juvenile swimming crab, *Portunus trituberculatus*[J]. *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 2017, 69: 1421.
- [3] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2021 中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2021.
- [4] 占二新. 三疣梭子蟹常见病害及防治措施[J]. 新农村 (黑龙江), 2018(8): 184.
- [5] 高振华. 三疣梭子蟹育苗过程中的病害及预防措施[J]. *科学养鱼*, 2016(11): 59-60.
- [6] Cheng S, Jia Y Y, Chi M L, *et al.* The exploration of artificial incubation of *Cherax quadricarinatus* eggs[J]. *Aquaculture*, 2020, 529: 735576.
- [7] 王吉桥, 刘晶, 姜静颖, 等. 中华绒螯蟹卵膜和腹肢的形态及卵附着机制[J]. 水产学杂志, 2006, 19(2): 32-36.
- [8] 薛俊增, 吴惠仙. 三疣梭子蟹卵附着机制及相关形态学特征[J]. 动物学报, 2004, 50(5): 873-879.
- [9] 周秋白, 陈国华, 余吉生. 中华绒螯蟹人工育苗中聚缩虫防治效果的研究[J]. 江西水产科技, 1995(1): 8-9,14.
- [10] 万夕和, 李筠, 张美如, 等. 中华绒螯蟹苗期丝状细菌病原HL-1的研究[J]. *中国水产科学*, 2003, 10(5): 392-

- 397.
- Wan X H, Li Y, Zhang M R, *et al.* A pathogen HL-1 isolated from *Eriocheir sinensis* larvae with filamentous bacterial disease[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2003, 10(5): 392-397 (in Chinese).
- [11] Edgerton B F, Evans L H, Stephens F J, *et al.* Synopsis of freshwater crayfish diseases and commensal organisms[J]. *Aquaculture*, 2002, 206(1-2): 57-135.
- [12] Carral J M, Pérez J R, Celada J D, *et al.* Effects of dead egg removal frequency on stage 2 juvenile production in artificial incubation of *Austropotamobius pallipes* Lereboullet[J]. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*, 2004, 372-373: 425-430.
- [13] 廖永岩, 赵丽梅. 抗真菌药物对远海梭子蟹离体胚胎(卵)孵化及幼体培育的影响[J]. *台湾海峡*, 2001, 20(3): 363-370.
- Liao Y Y, Zhao L M. Hatching and larval culture of *in vitro* embryo of *Portunus pelagicus* under anti-fungus[J]. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 2001, 20(3): 363-370 (in Chinese).
- [14] 鲍鹰, 刘军, 林少军. 中华绒螯蟹受精卵离体培育的初步研究[J]. *海洋科学*, 1999(1): 55-58.
- Bao Y, Liu J, Lin S J. Study on the breeding of *in vitro* embryo of mitten crab (*Eriocheir sinensis*)[J]. *Marine Sciences*, 1999(1): 55-58 (in Chinese).
- [15] 堵南山, 赖伟, 南春容, 等. 中华绒螯蟹成熟卵形态和超微结构的研究[J]. *动物学报*, 1995, 41(3): 229-234.
- Du N S, Lai W, Nan C R, *et al.* The morphology and ultrastructure of the mature egg of *Eriocheir sinensis* (Crustacea, Decapoda)[J]. *Acta Zoologica Sinica*, 1995, 41(3): 229-234 (in Chinese).
- [16] Cheung T S. The development of egg-membranes and egg attachment in the shore crab, *Carcinus maenas*, and some related decapods[J]. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 1966, 46(2): 373-400.
- [17] Pillai M C, Clark W H Jr. Hatching envelope formation in shrimp (*Sicyonia ingentis*) ova: origin and sequential exocytosis of cortical vesicles[J]. *Tissue and Cell*, 1988, 20(6): 941-952.
- [18] 康现江, 李少菁, 王桂忠, 等. 锯缘青蟹卵膜变化与卵子附着研究[J]. *水产学报*, 2000, 24(6): 500-504.
- Kang X J, Li S J, Wang G Z, *et al.* Studies on the egg membrane variation and egg attachment in *Scylla serrata*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2000, 24(6): 500-504 (in Chinese).
- [19] Lee T H. Relationship between hatching rate and the outer egg membranes of the *in vitro* artificially fertilized eggs of the Japanese mitten crab *Eriocheir japonica*[J]. *Aquaculture*, 2009, 298(1-2): 168-171.
- [20] Lee T H. A method for reducing the thickness of the outer egg membrane of the Japanese mitten crab *Eriocheir japonica* to improve the normal zoeal larvae hatching rate of *in vitro* artificial fertilized eggs[J]. *Aquaculture*, 2011, 318(1-2): 176-179.
- [21] 陈锦民. 锯缘青蟹 *Scylla serrata* (Forskål) 胚胎发育的基础研究 [D]. 厦门: 厦门大学, 2005.
- Chen J M. Foundational studies on the embryonic development of the mud crab, *Scylla serrata* (Forskål)[D]. Xiamen: Xiamen University, 2015 (in Chinese).
- [22] 曾朝曙, 王桂忠, 李少菁. 锯缘青蟹胚胎发育的观察及温度影响胚胎发育的研究[J]. *福建水产*, 1991(1): 45-50.
- Zeng Z S, Wang G Z, Li S J. Observation on embryo development of *Scylla serrata* and the effect of temperature on embryo development[J]. *Fujian Fisheries*, 1991(1): 45-50 (in Chinese).
- [23] 张晓军, 崔朝霞, 樊拥军, 等. 用mRNA差异显示技术分析中华绒螯蟹早期发育的基因表达[J]. *海洋科学*, 2001, 25(5): 34-37.
- Zhang X J, Cui Z X, Fan Y J, *et al.* Analysis of gene expression in early developmental embryo of *Eriocheir sinensis* using mRNA differential display[J]. *Marine Sciences*, 2001, 25(5): 34-37 (in Chinese).
- [24] 祝世军. 三疣梭子蟹亲蟹培育及提高其受精卵孵化率的研究[J]. *河北渔业*, 2005(4): 9-10.
- Zhu S J. Cultivation of brood stock of swimming crab (*Portunus trituberculatus*) and improvement of hatching rate of their fertilized eggs[J]. *Hebei Fisheries*, 2005(4): 9-10 (in Chinese).
- [25] Carral J M, Sáez-Royuela M, Celada J D, *et al.* Advantages of artificial reproduction techniques for white-clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes* Lereboullet)[J]. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*, 2003(370-371): 181-184.
- [26] 陆家平, 王洪发, 张淑美, 等. 对虾病毒病害综合防治系统工程操作要点[J]. *海洋科学*, 1996, 2: 13-15.
- Lu J P, Wang H F, Zhang S M, *et al.* Operating point on



- comprehensive prevention-systemizing engineering of virus and pathogenic bacteria of shrimp[J]. *Marine Sciences*, 1996, 2: 13-15 (in Chinese).
- [27] 杨其彬, 李晓兰, 孙苗苗, 等. 斑节对虾虾苗活力检测方法[J]. *南方水产科学*, 2010, 6(1): 12-18.  
Yang Q B, Li X L, Sun M M, *et al.* Methods of testing vitality of postlarvae of *Penaeus monodon*[J]. *South China Fisheries Science*, 2010, 6(1): 12-18 (in Chinese).
- [28] Quintio E T, dela Cruz-Huervana J J, Parado-Esteva F D. Quality assessment of newly hatched mud crab, *Scylla serrata*, larvae[J]. *Aquaculture Research*, 2018, 49(1): 75-80.
- [29] 李为, 荣宽, 覃丽蓉, 等. 水产动物行为及其在渔业中的应用研究进展[J]. *水生生物学报*, 2021, 45(5): 1171-1180.
- Li W, Rong K, Qin L R, *et al.* Research progress of aquatic animal behavior and its application in fisheries[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2021, 45(5): 1171-1180 (in Chinese).
- [30] 何平国, Wardlc C S. 鱼类游泳运动的研究— I、三种海洋鱼类游泳的运动学特性[J]. *青岛海洋大学学报*, 1989, 19(S2): 111-118.  
He P G, Wardlc C S. Studies on fish swimming I. Swimming kinematics of three species of marine fishes[J]. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 1989, 19(S2): 111-118 (in Chinese).

## Exploration of *in vitro* incubation of *Portunus trituberculatus* eggs

NIU Xueying<sup>1</sup>, REN Zhiming<sup>2</sup>, WU Jiaying<sup>1</sup>, MU Changkao<sup>1\*</sup>, WANG Chunlin<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology of Ministry of Education,  
School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. School of Faculty of Mechanical Engineering & Mechanics, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

**Abstract:** In order to explore the *in vitro* incubation technique of fertilized eggs of *Portunus trituberculatus*, this study firstly screened the most suitable isolation solution for fertilized egg blocks, then conducted *in vitro* incubation studies of fertilized eggs at different developmental stages and transmission electron microscopy observation of fertilized egg membranes after treatment with the isolation solution, and finally measured the larval viability of fertilized eggs treated with the isolation solution after hatching. The results showed that papain was an ideal separation solution, and the separation rate was more than 99% with a concentration of 0.09 g/mL and separation time at 30 min. The highest hatching rate of 89.0%±3.3% was recorded for *in vitro* embryos in zoea stage, compared to 70.0%±4.8% for the control group. The lowest hatching rate for *in vitro* embryos was observed at the cleavage stage, which was 58.0%±3.9%, and that for the control group was 31.0%±2.3%. In general, compared with the control group, the hatching rate of the treatment group increased significantly; the observation results of transmission electron microscopy also supported this phenomenon with the structure of fertilized egg membrane being loose and its thickness decreased after the separation solution treatment; exposure to air, formalin solution stress and behavioral test were used to evaluate the quality of larvae in different treatment groups. The results showed that there was no significant difference in the vitality of larvae in treatment group and control group. In conclusion, the isolation solution obtained in this study can effectively improve the hatching rate of fertilized *P. trituberculatus* eggs without affecting the larval vitality, and our results can provide a reference for the *in vitro* embryos hatching of *P. trituberculatus* and other crustaceans.

**Key words:** *Portunus trituberculatus*; *in vitro* hatching; hatching rate; larval vitality

**Corresponding author:** MU Changkao. E-mail: muchangkao@nbu.edu.cn

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (42076087)