

文章编号: 1004 - 7271(2006)01 - 0041 - 06

第一次及第二次抱卵的中华绒螯蟹胚胎和 Z_1 幼体质量的比较

南天佐, 成永旭, 吴旭干, 王金庆, 王丽娟, 刘必林

(上海水产大学农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室, 上海 200090)

摘要:以中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)胚胎的湿重、胚胎直径、含水率、总脂和 Z_1 幼体的体长、累计死亡指数(CMI)、50%死亡时间(PNR_{50})为评价指标,比较了第一次及第二次抱卵的胚胎和 Z_1 幼体的性能。结果表明,两次抱卵的胚胎直径、湿重、干重具有显著性差异($P < 0.05$)。两次抱卵的胚胎含水率接近。在发育初期胚胎总脂的含量差异不大($P > 0.05$),在孵化前第二次抱卵胚胎的总脂含量低于第一次抱卵胚胎($P < 0.05$)。两次初孵 Z_1 幼体的体长、总脂、CMI、 PNR_{50} 差异显著($P < 0.05$)。综合各指标,第二次抱卵孵化所得的 Z_1 幼体的质量不如第一次抱卵。

关键词:中华绒螯蟹;胚胎; Z_1 幼体

中图分类号 S 917 文献标识码: A

Comparison on the first and second berried crab on embryo and larval quality (Z_1) of *Eriocheir sinensis*

NAN Tian-zuo, CHENG Yong-xu, WU Xu-gan, WANG Jin-qin, WANG Li-juan, LIU Bi-lin

(Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquacultural Ecosystem Certified by the
Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: Characteristics of embryo and Z_1 of *Eriocheir sinensis* females from 1st and 2nd brood have been investigated. Egg size, wet weight and dry material weight of every embryo in the 1st brood are significantly higher than those of the 2nd ($P < 0.05$). There are no significant difference in water content between the two embryos ($P > 0.05$). The water content of the two embryos increased as the embryos developed ($P < 0.05$). Total lipid decreased gradually as the embryo developed, but only during the 2nd time, it decreases obviously ($P < 0.05$). Z_1 size, total lipid, CMI and PNR_{50} of the two times are significantly different ($P < 0.05$). It indicates that the quality of Z_1 in 2nd brood is not up to that of the first.

Key words: *Eriocheir sinensis*; embryo; Z_1

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)俗称河蟹,是我国重要的经济蟹类。河蟹在第一次抱卵期间卵巢就已开始第二次发育,第一次卵孵化后很快会进行第二次排卵,经短暂的胚胎发育期就会孵化出膜,产生第

收稿日期 2005-04-20

基金项目:国家自然科学基金(39900112)、曙光计划(02SG40);上海市重点学科建设项目(Y1101)

作者简介:南天佐(1978-),男,内蒙古包头人,硕士研究生,专业方向为水产动物营养与饲料。E-mail: tznan@163.com

通讯作者:成永旭(1964-),男,河南济源人,教授,博士生导师,主要从事水产动物营养繁殖学研究。E-mail: yxcheng@shfu.edu.cn

二次 Z_1 幼体。目前,大多数研究都集中在卵巢的第一次发育过程,而对第二次发育的研究很少^[1,2]。对第二次发育的研究不仅可以更加全面地了解发育过程,同时还可以为第二次育苗生产可行性提供理论参考。对保障苗种的可靠供应和提高优良亲本的利用率有重要意义。

1 材料与方法

1.1 实验用蟹

实验用蟹于2002年10月至2003年5月间取自上海瀛生公司育苗基地亲蟹培养池。第一次和第二次抱卵蟹均挑选活力强,肢体健全,无损伤,个体相差不大的雌蟹。第一次及第二次胚胎发育实验和 Z_1 幼体实验用蟹均挑选三只抱卵蟹分别放入150 L的水族箱中饲养,箱底置瓦片供抱卵蟹隐蔽,培养用水盐度15。

1.2 实验方法

1.2.1 胚胎的性状

据张烈士等^[3]堵南山等^[4]将中华绒螯蟹胚胎发育分为:卵裂期、囊胚期、原肠期、眼点期、心跳期。

胚胎直径的测量 挑选三只蟹,每只蟹上取50个发育良好的受精卵,分别放入1.5 mL的离心管里,加入煮沸后冷却的新鲜海水,每天换水一次,两天测量一次。

胚胎干、湿重的计算 在第一次及第二次排卵后,每两天取胚胎一次,重复3只蟹。每只蟹每次取胚胎0.3 g左右,吸干胚胎间水分后在电子天平(0.1 mg)上准确称重后计数。胚胎湿重 = 胚胎总重/胚胎的个数;干物质重 = (1 - 含水率) × 单个胚胎的湿重。

总脂的测定 采用Folch法^[5]。按GB 6435-1986于105℃烘干测定水分。

1.2.2 Z_1 幼体质量的判别

体长 幼体孵化后每只水族箱取50只 Z_1 幼体,福尔马林固定后测量头胸甲长度。

抗盐度试验 抗盐度变化实验参照Rees等^[6]。具体如下,每个孵化箱取初孵 Z_1 幼体45只,平均放入3个塑料杯,杯中盛有300 mL蒸馏水。每隔5 min观察并记录死亡个体数,观察持续1 h。死亡标准为用软针拨动幼体,幼体附肢没有反应。实验结束后统计1 h的累计死亡指数(cumulative mortality index, CMI) = D5 + D10 + D15 + D20 + + D60。D5, D10, D15分别代表5 min, 10 min, 15 min时的死亡率。

抗饥饿试验 幼体抗饥饿实验参照Strussmann等^[7]和Mushiake等^[8]。具体如下,取初孵 Z_1 幼体90只,平均放入3只烧杯中,烧杯中盛有400 mL盐度为15的过滤海水,水浴控温在 21 ± 0.5 °C,每隔6 h检查一次死亡情况,同时取出死亡个体,直到幼体全部死亡,死亡标准同抗盐度变化实验。实验结束统计50%死亡时间,即 PNR_{50} (point of no return when 50% mortality)。

1.3 数据处理

在SPSS数据处理软件上统计计算平均值、标准误,并用ANVOA系统进行比较。

2 结果

2.1 第一次及第二次抱卵的胚胎质量比较

第二次抱卵的胚胎在卵裂期的直径为 335 ± 8 μm ,显著小于第一次抱卵同期的胚胎直径(380 ± 12 μm) ($P < 0.05$)。由图1可以看出整个胚胎发育过程中第一次、第二次抱卵的卵径增大趋势明显。第二次抱卵的胚胎直径从卵裂期到囊胚期增大幅度不显著($P > 0.05$),从囊胚期到心跳期胚胎显著增大($P < 0.05$),尤其是从囊胚期到原肠期,增幅为30 μm 左右。而第一次抱卵胚胎从卵裂期到原肠期的直径增加不显著,从原肠期开始每一期比前一期增大20 μm 左右。

处于卵裂期第二次胚胎的湿重为 25.4 ± 0.97 μg (图2),极显著小于同期的第一次抱卵胚胎

($38.58 \pm 1.57 \mu\text{g}$) ($P < 0.01$)。第二次抱卵的胚胎湿重从卵裂期到原肠期增加不显著 ($P > 0.05$)，而第一次抱卵在该段时期内有显著增加 ($P < 0.05$)。第二次抱卵的胚胎湿重从眼点期到心跳期的增加幅度最大，达到 $12.52 \mu\text{g}$ ，而第一次卵在同一时期的增加只有 $7.04 \mu\text{g}$ 。

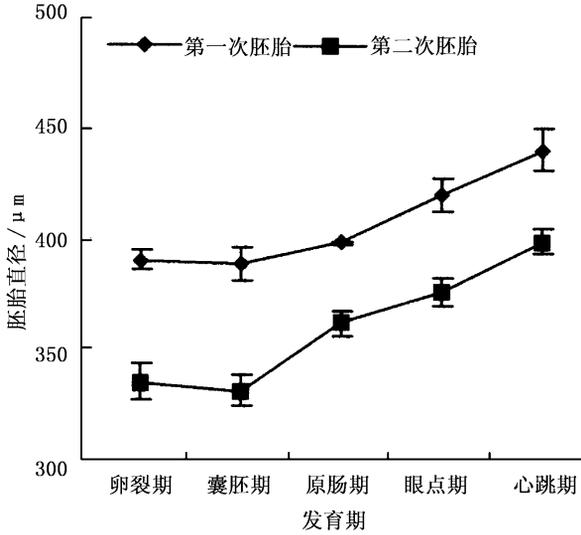


图 1 第一次及第二次抱卵河蟹胚胎直径变化
Fig.1 Variations on size of the embryo from 1st and 2nd brood of *E. sinensis*

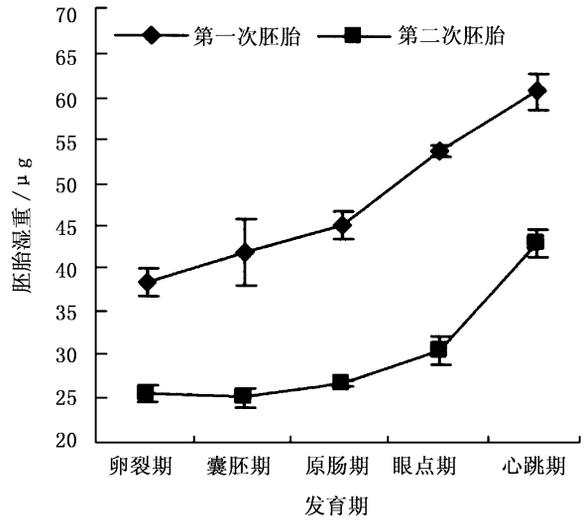


图 2 第一次及第二次抱卵河蟹胚胎湿重变化
Fig.2 Variations on wet weight of the embryo from 1st and 2nd brood of *E. sinensis*

第一次及第二次抱卵胚胎含水率在卵裂期差异不显著 ($P > 0.05$)，此时第二次抱卵胚胎干重 ($9.65 \pm 0.30 \mu\text{g}$) 也极显著小于第一次抱卵胚胎 ($13.36 \pm 1.31 \mu\text{g}$) ($P < 0.01$)。两次抱卵胚胎发育期间，胚胎干重均呈显著下降趋势 ($P < 0.01$) (图 3)。不过第一次抱卵胚胎分别在从卵裂期到囊胚期与从原肠期到眼点期的下降显著 ($P < 0.05$)，而第二次抱卵胚胎从囊胚期到眼点期下降显著 ($P < 0.05$)。比较第一次及第二次抱卵胚胎的含水率变化发现，第一次抱卵从卵裂期到原肠期含水率没有显著增长 (图 4)，从原肠期开始每期增加约 5% ($P < 0.05$)。第二次抱卵胚胎从卵裂期到囊胚期含水率没有显著增长，从囊胚期开始，含水率每期增加约 3% ($P < 0.05$)。

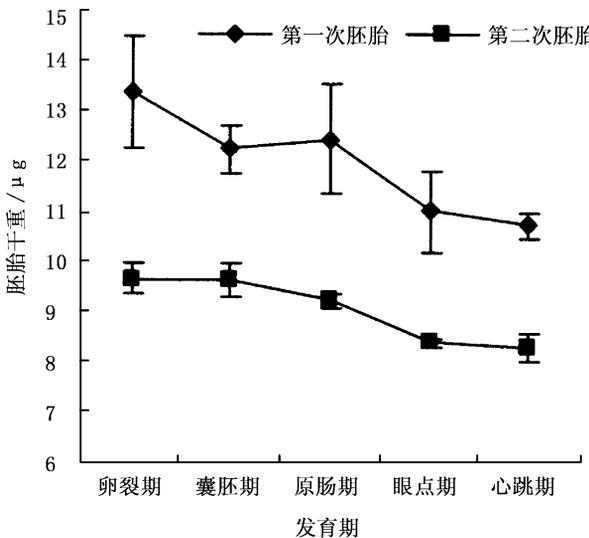


图 3 第一次及第二次抱卵河蟹胚胎干重变化
Fig.3 Variations on dry material of the embryo from 1st and 2nd brood of *E. sinensis*

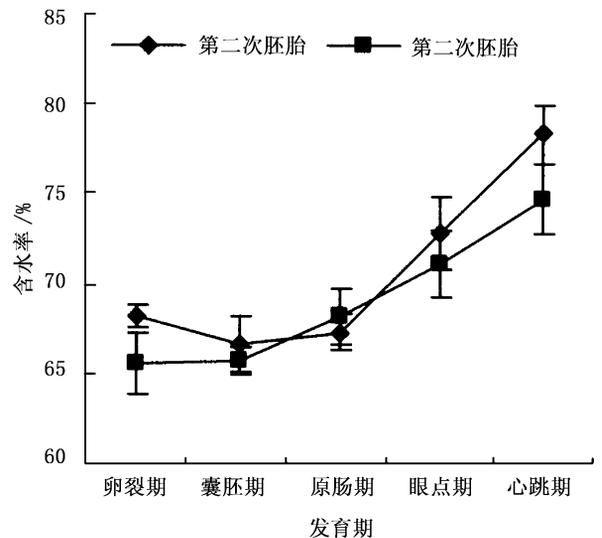


图 4 第一次及第二次抱卵河蟹胚胎含水率变化
Fig.4 Variations on water content of the embryo from 1st and 2nd brood of *E. sinensis*

处于卵裂期的第一次及第二次抱卵胚胎的总脂含量无差异[第一次抱卵胚胎为(21.19 ± 0.28)% ,第二次为(18.54 ± 2.01)%]($P > 0.05$)。第一次及第二次抱卵胚胎发育过程中总脂含量均显著下降($P < 0.05$),在发育至心跳期孵化前第二次卵的总脂含量低于第一次抱卵胚胎($P < 0.05$)。

2.2 第一次及第二次抱卵孵化的 Z_1 幼体性状比较

由表 1 可以看出第二次抱卵 Z_1 幼体的体长显著小于第一次抱卵 Z_1 幼体($P < 0.01$) ,二者相差近 90 μm 。 Z_1 幼体的水分含量相差不大($P > 0.05$) ,都接近 90%。此处的含水率都显著大于各自胚胎在心跳期胚胎的含水率 ,说明 Z_1 幼体在孵化出膜之前 ,体组织大量吸水。第二次抱卵 Z_1 幼体的总脂/干物质值小于第一次($P < 0.05$)。

抗盐度实验表明两种 Z_1 幼体的耐盐度能力差异较显著($P < 0.01$)。第二次抱卵 Z_1 幼体的在抗盐度实验后 60 min 内的累计死亡率比第一次 Z_1 幼体的高约一倍。同时从幼体的抗盐度死亡指数曲线(图 6)可以明显的看出 ,前 20 min 两者的死亡率相差不大 ,都接近 0 ,第 25 min 开始 ,第二次 Z_1 幼体的死亡率显著高于第一次抱卵 Z_1 幼体。第二次抱卵 Z_1 幼体基本在 60 min 内达到 100% 的死亡率 ,而第一次抱卵 Z_1 幼体要在 90 min 时才能全部死亡。

表 1 第一次及第二次抱卵孵化的 Z_1 幼体性状比较

Tab.1 Comparison on newly hatched Z_1 from 1st and 2nd brood of *Eriocheir sinensis*

Z_1 幼体性状	第一次 Z_1 幼体	第二次 Z_1 幼体	显著性
体长 (μm , n = 50)	606 ± 4	517.87 ± 4.60	$P < 0.01$
水分含量 (%)	89.01 ± 0.97	88.77 ± 0.60	NS
总脂/干物质 (%)	14.31 ± 1.2	11.45 ± 0.97	$P < 0.05$
CMI (n = 3)	336.30 ± 1.28	672.59 ± 1.04	$P < 0.01$
PNR50 (h, n = 3)	200.00 ± 22.98	143.63 ± 4.76	$P < 0.01$

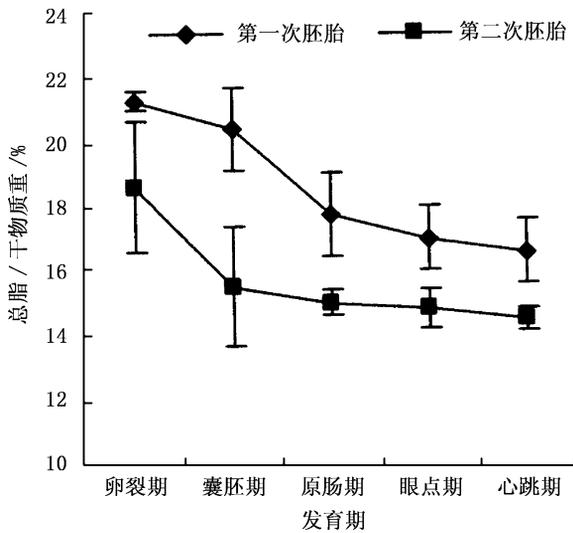


图 5 第一次及第二次抱卵河蟹胚胎总脂含量变化

Fig.5 Variations on total lipid of the embryo from 1st and 2nd brood of *E. sinensis*

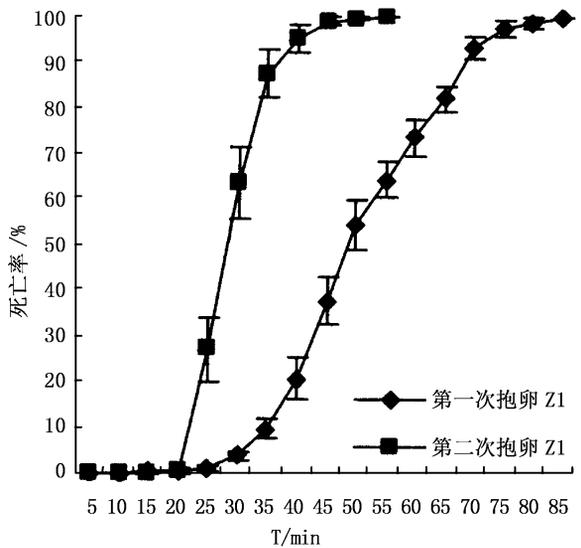


图 6 第一次及第二次抱卵孵化的 Z_1 幼体抗盐度死亡率

Fig.6 Mortality of Z_1 from 1st and 2nd brood of *E. sinensis* under osmotic shock

抗饥饿实验表明这两类 Z_1 幼体在饥饿状况下的 PNR_{50} 差异极显著 ($P < 0.01$) (图 7)。饥饿前 4 天, 均没有出现死亡个体。第 5 天第二次抱卵 Z_1 幼体开始出现死亡, 而第一次抱卵 Z_1 幼体到第 6 天才出现死亡个体, 此后第一次抱卵 Z_1 幼体的成活率一直高于第二次抱卵 Z_1 幼体, 直到第 12 天实验结束。第一次抱卵 Z_1 幼体的全部死亡时间为 12 天, 而第二次抱卵 Z_1 幼体在第 9 天就全部死亡。第一次抱卵 Z_1 幼体在该实验的后期虽然未进食, 但还是有些蜕壳变为 Z_2 幼体。在第二次抱卵 Z_1 幼体中没有这种现象。

3 讨论

3.1 第一次、第二次抱卵的胚胎性状差异

中华绒螯蟹第一次抱卵的卵径明显大于第二次抱卵, Palacios^[2] 对南美白对虾的研究也发现了类似的现象。在胚胎生长发育的不同时期胚胎直径有明显变化, 呈增大趋势。韦受庆等^[9], 成永旭等^[10] 对锯缘青蟹的研究都表明了这一点。两次抱卵都是发育前期变化较小而后后期胚胎直径变化较大, 对青蟹的研究结果与此相似^[9, 10]。不过第二次胚胎在囊胚期到原肠期的胚胎直径增加幅度较第一次大, 这可能是由于温度升高胚胎发育加快, 干物质消耗多, 因而胚胎直径变化显著 ($P < 0.05$)。

3.2 胚胎发育过程中脂类变化

总脂含量在胚胎发育起始即卵裂期没有差异 ($P > 0.05$), 在心跳期差异显著 ($P < 0.05$)。这可能与温度升高有关。国外有关虾蟹类胚胎发育期生化组成和能量利用的研究较多^[11-18], 在胚胎发育过程中由于能量消耗, 胚胎中的干物质必然减少, 这一点是毫无争议的^[19]。普遍认为甲壳动物胚胎发育过程中以脂类为主要的能源物质^[12-15], 但也存在不少争议^[16-19]。王桂忠等^[20] 认为甲壳动物胚胎到底以何种物质为主要的能源物质取决于其生境。中华绒螯蟹主要是生长在温带, 推断它的主要能量来源应该是脂类。第一次及第二次胚胎发育期间温度不同, 这可能也将影响卵的能量利用方式。

3.3 Z_1 幼体质量比较

在抗饥饿实验中第二次抱卵 Z_1 幼体与第一次抱卵 Z_1 幼体的差异显著, 这与第二次抱卵 Z_1 幼体在孵化初开口前体内总脂含量显著低于第一次相符。大多数营自体营养、多幼体阶段的海水经济虾蟹类 (蚤状幼体阶段大于 5) 的幼体抗饥饿能力很差, 如果缺乏食物几乎发育不到下一阶段^[21], 一些幼体靠体内的内源性卵黄仍能发育倒下一阶段, 但多为淡水或半陆栖种类。初孵幼体的抗饥饿能力有种间差异^[22]。幼体在发育过程中主要以储存脂源为能量物质, 所以幼体脂类条件对幼体的抗饥饿和进一步发育有重要影响。幼体抗饥饿能力主要取决于体内的能源物质 (脂类和蛋白质) 储存的多少^[22-24], 一般认为蟹类幼体饥饿时首先动用脂类, 然后才是蛋白质^[25]。幼体抗盐度变化能力和它体内的脂类组成密切相关^[6]。

第二次抱卵 Z_1 幼体的性状明显不如第一次抱卵。但究竟是环境如温度、盐度或营养等因子还是遗传因素的结果还没有定论。苗种生产量不稳定或出苗时间过于集中是水产苗种业发展的障碍^[25]。所以, 研究第二次育苗对于保障苗种供应很有意义。同时, 对第二次苗种的营养缺陷的分析还可提供亲本强化饲料营养配比的线索, 不过这需要更进一步的工作来确定。

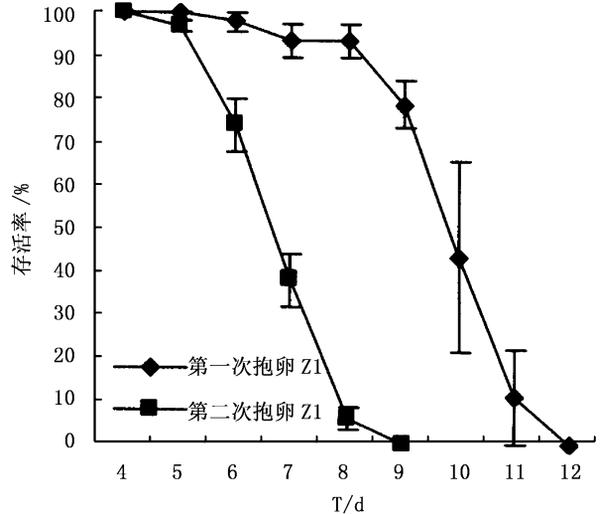


图 7 第一次及第二次抱卵孵化的 Z_1 幼体抗饥饿存活率

Fig. 7 Survival of starved Z_1 from 1st and 2nd brood of *E. sinensis* under condition of salinity from 0 to 15

参考文献：

- [1] Hansford S W and Marsden G E. Temporal variation in egg and larval productivity of eyestalk avlated spawners of th Prawn *Penaeus monodon* from Cook Bay ,Australia[J]. Journal of the World Aquaculture Society , 1995 , 26(4) :134 - 146.
- [2] Palacios E , Perez-Rostro C I , Ramirez J L , et al . Reproductive exhaustion in shrimp (*Penaeus vannamei*) reflected in larval biochemica[J]. Aquaculture , 1999 , 171 : 309 - 321.
- [3] 张列士 . 河蟹增殖技术 [M]. 北京 : 金盾出版社 , 2002.
- [4] 堵南山 赵云龙 赖伟 . 中华绒螯蟹胚胎发育的研究 [A]. 甲壳动物学会编 . 甲壳动物学论文集 (第三集) [C]. 青岛 : 青岛海洋大学出版社 , 1992 . 128 - 135.
- [5] Folch L M , Sloanstanley G H . A simple method for the isolation ang purification of total lipids from animal tissues[J]. J Biol Chem , 1957 , 226 : 497 - 509.
- [6] Rees J F , Cure K , Piyatitivorakul S , et al . Highly unsaturated fatty acid requirements of *penaeus monodon* post larvae : an experimental approach based on artemia enrichment[J]. Aquaculture , 1994 , 122 : 193 - 207.
- [7] Strussmann C A , Takashima F . PNR , Histology and Morphometry of starved *pejerry odontesthes bonariensis* larva[J]. Nippon Suisan Gakkaishi , 1989 , 55(2) : 237 - 246.
- [8] Mushiake K , Fujimoto H , Shimma H . A trail of evaluation of activity in yellowtail , *Seriola quinqueradiata* larva[J]. Suisan Zoshoku , 1993 , 41 : 339 - 344(in Japanese with English abstract).
- [9] 韦受庆 罗远裕 . 青蟹胚胎发生的研究 [J]. 热带海洋 , 1986 , 5(3) : 57 - 62.
- [10] 成永旭 李少菁 王桂忠 . 锯缘青蟹胚胎发育期脂类变化的研究 [J]. 海洋学报 , 2000 , 22(增刊) : 22 - 29.
- [11] Sasaki G C , Capuzzo J M , Biesiot P . Nutritional and bioenergetic considerations in the development of the americal lobster *Homarus americanus* [J]. Can J Fish Aquat Sci , 1986 , 43 : 113 - 121.
- [12] Lucas M I , Crisp D J . Energy Metabolism of eggs during embryogenesis in balanus balanoides[J]. J Mar Biol Ass U K , 1987 , 67 : 27 - 54.
- [13] Erri Babu D . Observation on the embryonic development and energy source in the crab *Xantho bidentatus*[J]. Marine Biology , 1987 , 95 : 123 - 127.
- [14] Jean A , Christiane H . Embryonic development and energetic investement in egg production in relation to size of female lobster[J]. Can J Fish Aquat Sci , 1987 , 44 : 7 - 25.
- [15] Clarke A , Brown J H , Holmes L J . The biochemical composition of eggs from *Macrobrachium rosenbergii* in relation to embryonic development[J]. Comp Biochem Physiol , 1990 , 96B : 505 - 511
- [16] Valdes L , Alvarez-Ossorio M T , Gonzaaalez-Gurriaran E . Incubation of eggs of *Necora puber* : volume and biomass changes in embryonic development [J]. Crustaceana , 1991 , 60 : 162 - 177.
- [17] Petersen S , Anger K . Chemical and physiological changes duing the embryonic development of the spider crab *Hyas araneus*[J]. Comp Biochem Physical , 1997 , 117B : 299 - 306.
- [18] Pandian T J . Yolk utilization and hatching time in the Canadian lobster *Homarus americanus*[J]. Mar Biol , 1970 , 7 : 249 - 254.
- [19] Cavalli R O , Lavens P , Sorgeloos P . Performance of *Macrobrachium rosenbergii* broodstock fed diets with different fatty acid composition[J]. Aquac , 1999 , 179 : 387 - 402.
- [20] 王桂忠 汤鸿 李少菁 等 . 锯缘青蟹胚胎发育过程主要生化组成 [J]. 台湾海峡 , 1995 , 14(3) : 280 - 283.
- [21] Anger K . Elemental composition(CHN) , growth and exuvial loss in the larval stage of two semiterrestrial crabs , *Sesarma curacaoese* and *Armasas miersii*[J]. Comparative Biochemitry and Physiology , 1995 , 111A(4) : 615 - 623.
- [22] 成永旭 李少菁 王桂忠 . 锯缘青蟹卵黄发生期卵巢和肝胰腺脂类的变化 [J]. 海洋学报 , 2001 , 23(3) : 66 - 77.
- [23] Anger K , Spindler K D . Energetics , moult cycle and ecdysteroid titers in spider crab (*Hyas araneus*) larvae starved after the D threshold[J]. Mar Biol , 1987 , 94 : 367 - 375.
- [24] 朱小明 李少菁 . 生态能与虾蟹幼体培育 [J]. 中国水产科学 , 1998 , 5(3) : 104 - 107.
- [25] 翁幼竹 李少菁 王桂忠 . 饥饿对锯缘青蟹幼体生化组成的影响 [J]. 厦门大学学报 , 2002 , 41(1) : 84 - 87.