

锯缘青蟹胚胎发育的观察 及温度影响胚胎发育的研究

曾朝曙 王桂忠 李少菁

(厦门大学海洋学系 361005)

摘 要

在实验室恒温条件下对锯缘青蟹 [*Scylla serrata*(Forsk.)] 胚胎发育的观察及温度影响胚胎发育的研究结果表明锯缘青蟹胚胎可发育的温度在 $>15^{\circ}\text{C}$ 而 $<35^{\circ}\text{C}$, 较适宜温度为 $20-30^{\circ}\text{C}$ 。提高温度胚胎发育速度在 $20-25^{\circ}\text{C}$ 间的变化大于在 $25-30^{\circ}\text{C}$, Q_{10} 值约为2.9。青蟹胚胎发育可分为十期, 温度对各期发育的影响不尽相同, 本文报道了各发育期在不同温度下的发育时间, 据此可准确预报抱卵蟹孵化日期。此外, 还报道了人工诱导亲蟹在非繁殖季节产卵技术及离体卵孵育方法。

一、前 言

锯缘青蟹是我国传统名贵海产, 近年来, 随着水产养殖业的蓬勃发展, 青蟹人工养殖也在我国东南沿海兴起, 但青蟹人工育苗在国内外均未达生产水平, 未能为青蟹养殖业提供苗种保障。为此, 几年来我们进行了青蟹人工育苗及幼体实验生态研究。在开展研究工作中, 我们深深感到, 青蟹繁殖的季节性是幼体实验生态研究的一个制约因素。能否诱导亲蟹在非繁殖季节产卵, 为实验研究提供材料, 使幼体实验生态研究工作摆脱季节限制, 是我们工作目的之一。尤为重要的是, 青蟹胚胎发育的好坏是育苗成败的关键, 能否准确预报亲蟹的孵化日期, 以便做好育苗前的准备工作, 亦是育苗工作的重要环节。鉴此, 我们在实验室恒温控制的条件下观察了青蟹胚胎的发育过程, 并就温度影响胚胎发育及人工诱导亲蟹在非繁殖季节的产卵及孵育进行了研究。

二、材料和方法

选取性腺饱满的雌蟹, 切除其双侧眼柄后培养于装有新鲜沙滤海水的塑料水槽内

收稿时间: 1990年11月26日。

($0.7 \times 0.25\text{m}$)，隔天换一次水，槽内水温以控温仪及加热器控制在 $20-25^{\circ}\text{C}$ 以诱导产卵。

用吸管收集散落在水槽底部的离体卵，用高压灭菌海水洗3—4次后再分置于装有少量膜滤海水(0.45)的结晶皿内静置孵育以观察离体卵的胚胎发育。培养水体3—4天更换一次。

温度对胚胎发育影响的试验分 10°C 、 15°C 、 25°C 、 27°C 、 30°C 和 35°C ($\pm 0.5^{\circ}\text{C}$)共6组。试验期间盐度为26—30‰。取刚产的未出现卵裂的卵进行离体恒温孵育。每200个卵置于直径为6cm的结晶皿内为一分样，每个温度设三个重复分样。另有卵数较多(置于9cm结晶皿中)的一个分样供取样检查之用。胚胎发育的早期(桑椹期前)每2—4小时检查一次，以后每天检查2—3次。先以解剖镜观察总体卵发育情况，然后从供取样检查的分样中取十来个较典型卵置于凹玻片上，在显微镜(Olympus BH—2)下仔细检查并确认其发育期。实验重复两次，分别于1986年4月9日和1987年4月27日。

三、结 果

1. 亲蟹抱卵胚胎的观察：

我们将青蟹的胚胎发育分为十期(表1)，这一划分主要是依据青蟹胚胎发育中一些易于观察的形态特征并参照其他几种蟹类胚胎的分期系统而确定的。表1中同时还列出韦受庆和罗远裕^[1]所描述的青蟹胚胎发育阶段，并将本分期系统与之进行对照比较。

据观察，青蟹刚产出的卵内外卵膜难以区分，在一侧有或深或浅的凹陷，故卵呈尖卵圆形等不甚规则状，这可能是被输卵管挤压所致。一小时后卵基本上变为圆形，外卵膜也逐渐膨大而与内膜分离。随着发育期的延长，卵的颜色逐渐由黄转褐黑色。如果抱卵亲蟹腹部卵块一直保持清爽洁净，一般孵化率都较高，但如果暂养抱卵雌蟹的池子老化，则会严重影响亲蟹所抱卵的质量，在这种情况下，卵表面常会粘着许多菌类及其他低等生物，从而使卵糜烂，并且大大降低孵化率。每隔数天将抱卵亲蟹放在含有药物的溶液中浸泡一小段时间，可以改善这种状况，将药物直接泼洒在亲蟹暂养池中也有—定效果。

2. 离体卵胚胎发育的观察：

离体卵指亲蟹在产卵时未能正常附于腹部附肢刚毛上而散落在培养水槽底部的卵粒。在青蟹非繁殖季节(冬季或早春)里，为了实验生态研究的需要，采取双侧切除性腺饱满的雌蟹眼柄及提高青蟹生活的环境水温至 $20-25^{\circ}\text{C}$ 的方法可以成功地诱导亲蟹在一周左右的时间内产卵(表2)，但—般这种情况下大部分卵未能粘着于腹部附肢刚毛上而散落于水槽底部成为离体卵，用前述的孵育法可将这些卵育成正常的蚤状幼体，并可成功地培育至稚蟹。在相似的培养条件下，这些幼体各发育期的干重值与正常抱卵孵化而来的幼体无明显差异(表3)，这说明离体卵的出现可能只是亲蟹产卵过程中某些环境因素不适宜而引起的生理效应所致，而卵本身则是正常的。

表1 青蟹胚胎各发育期形态划分标准

| 发育期 | 卵 形 态 | 对应于韦&罗(1986)的胚胎发育阶段划分 |
|-----|--|-----------------------|
| 1、 | 开始卵裂, 此时可见卵分裂为2、4、8个以及更多的细胞。 | 卵裂期 |
| 2、 | 卵裂进入表面囊胚阶段, 卵表面密集排列数不清的卵裂球。 | 囊胚、原肠期 |
| 3、 | 在卵的一侧出现一很小的隐约可见的透明区, 透明区中间部分较窄小, 卵径明显增大。 | 无节幼体期 |
| 4、 | 无色透明区已扩大成新月形, 约占整个卵面积的1/5, 左右在透明区内清晰可见略呈圆形的胚体附肢雏形。 | 五对附肢期 |
| 5、 | 无色透明区进一步扩大到占整个卵面积的1/4左右, 附肢雏形拉长, 卵黄区在靠近无色透明区部分色泽开始变淡、隐约可见卵黄块。 | 七对附肢期 |
| 6、 | 透明区已占整个卵面积的2/5左右, 胚体的整个卵黄区色泽变淡并转为透明, 卵黄块清晰可见。 | 复眼色素形成期 |
| 7、 | 透明区占整个卵的1/2左右, 呈弯眉状的棕红色复眼色素带出现, 逐渐变黑加大。 | |
| 8、 | 卵黄收缩呈蝶状的一块, 无色透明区进一步扩大, 胚体心跳出现, 眼点加粗变黑呈长椭圆形, 在胚体腹都有两条明显的体色素带出现。 | 准备孵化期 |
| 9、 | 心跳加快, 卵黄进一步收缩并变淡, 复眼已呈大而显眼的椭圆形, 复眼内各单眼分界逐渐分明, 呈放射状排列, 黑色体色素不仅在腹部, 而且在头胸部等处大量出现。胚体在卵膜内转动。 | |
| 10、 | 幼体孵出 | |

表2 诱导锯缘青蟹在冬季和早春产卵结果一览表 (1985—1987)

| 处 理 | 年 份 | 85 | 85 | 85 | 85 | 86 | 86 | 87 |
|----------------|-----|-------|-------|-------|-------|------|-----|------|
| 日 期 | 日 期 | 11.24 | 11.27 | 12.25 | 12.30 | 3.5 | 4.3 | 4.20 |
| 产 卵 | 年 份 | 85 | 85 | | 86 | 86 | 86 | 87 |
| 日 期 | 日 期 | 11.27 | 12.2 | 死亡* | 1.4 | 3.11 | 4.9 | 4.27 |
| 从处理到产卵的时间间隔(天) | | 3 | 5 | | 5 | 6 | 6 | 7 |

*: 由于没有及时清除残饵, 引起水质变坏而死亡。

在离体卵孵育中, 由于长时间的孵育过程中难以控制水体中细菌及其他小型原生动物的繁殖, 孵化率较低, 在水温25—30℃, 孵化率一般在15—20%, 但高者也可达30—40% (不包括原蚤状幼体)。如果从抱卵蟹腹部剪取发育后期的卵进行离体孵化, 则孵化率可达70—80%, 一般离体卵在前一、二天的孵育中都正常, 随后, 有些卵外膜则会过分膨胀, 且卵黄逐渐变为白色且疏散, 这些卵不久即腐解。离体卵胚胎的死亡常大量出

现在原肠期及临孵化时，而且会有相当数量的原蚤状幼体出现，表现为无吻、背刺或尾叉和头胸部附肢出现畸形。

3. 温度对各胚胎发育期发育的影响

温度对青蟹胚胎发育有明显影响，且对不同发育阶段的胚胎影响不同（图1）。总的看来，提高温度时胚胎发育的速率变化在20—25℃，大于在25—30℃， Q_{10} 值约为2.9。第2发育期胚胎的发育最易受影响，在低温时发育极为缓慢。当温度 $\leq 15^\circ\text{C}$ 或 $\geq 35^\circ\text{C}$ 时，胚胎发育不正常甚至死亡。温度为 35°C 时，胚胎卵裂参差不齐且不甚规则，经18小时卵裂至132细胞后停止卵裂并逐渐死亡。温度 $< 10^\circ\text{C}$ 时，发育极为缓慢，6天后才能观察到少量卵开始卵裂，且卵裂球极不规则，大小相差很大，此时相当数量的未卵裂卵业已死亡。14天后，卵裂才至32细胞期，直至第30天（实验终止）时仍停于此。当温度为 15°C 时，卵裂可正常进行至原肠期，但随后即停滞并逐渐死亡。据此，初步可以认为青蟹胚胎可发育温度范围 $> 15^\circ\text{C}$ 而 $< 35^\circ\text{C}$ ，较适宜的温度为20— 30°C 。

以Belehradek $D = a(T - \alpha)^b$ 的关系式表示青蟹胚胎发育全过程所需时间与温度的关系，由图2所示结果可算得 $a = 522$, $b = -1.38$, $\alpha = 11.7^\circ\text{C}$ ，故该式可表示为 $D = 522(T - 11.7)^{-1.38}$ 。式中D(天)是从产卵至孵化的胚胎发育全过程所需时间，T(℃)是胚胎孵育期间的平均水温，a, b是与曲线形状有关的常数， α (℃)是生态学零度，理论上在该温度下胚胎发育时

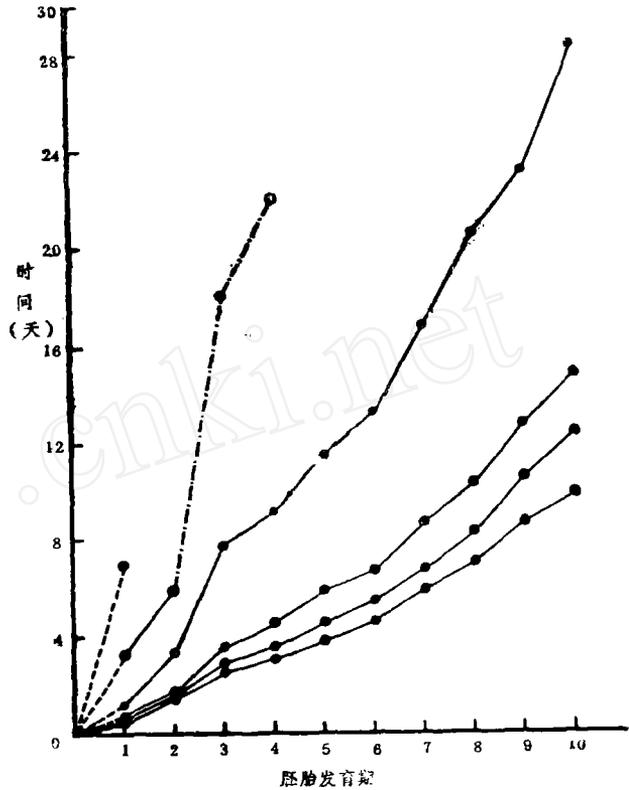


图1 青蟹各胚胎发育期发育时间与温度关系

--- 自产卵至第一期（卵裂）的发育由于试验准备与驯化，并非全在试验温度下进行。
- · - · - 在 15°C 下卵裂至细胞期后移至 16°C 下的胚胎发育时间

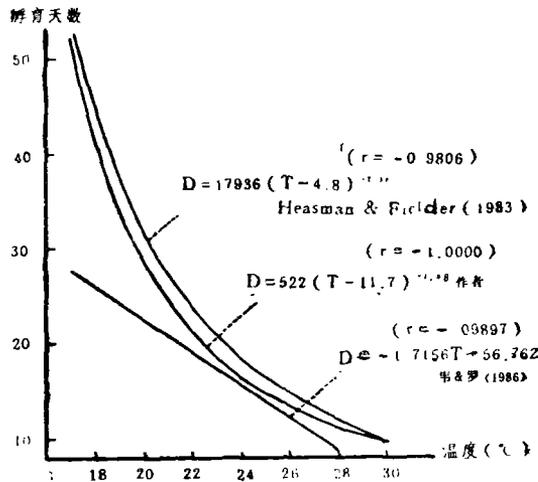


图2 青蟹胚胎孵化时间（自产卵至孵化）与温度关系

间为无限长。图 2 表示该关系曲线。

表 3：锯缘青蟹离体卵孵化的幼体与抱卵孵化的幼体各发育期干重 (ug/只) 的比较 (1987、5)

| 发育期 | 蚤一 | 蚤二 | 蚤三 | 蚤四 | 蚤五 | 刚变态的大眼幼体 | 刚变态的第一期稚蟹 |
|----------|-----------|-----------|-----------|------------|-------------|----------|-----------|
| 离体卵孵化的幼体 | 15.0 | — | 50.5 | 90.0—175.0 | 278.3—352.1 | 380.5 | 920 |
| 抱卵孵化的幼体 | 10.7—17.3 | 22.0—27.5 | 34.7—50.6 | 79.1—170.3 | 220.5—333.7 | 373.5 | 918 |

四、讨 论

如何准确地预报抱卵蟹的孵化日期。在幼体孵化前从饵料生物的培养, 养殖设备, 人员等方面做好充分准备, 是保证青蟹人工育苗顺利进行的前题条件。虽然 Heasman & Fielder^[5] 和韦受庆等^[1] 曾提出过青蟹从产卵到孵化的胚胎发育全过程所需的时间与温度的关系式, 但在实际工作中, 由于水温的季节性波动等因素, 单凭该式难以预报孵化日期。鉴于此, 我们观察记录了在 15—30℃ 青蟹各期胚胎发育的时间 (见图 1), 这样就可以根据定期检查抱卵蟹的胚胎发育程度及环境水温, 从该图估算发育时间, 从而准确预报孵化日期。近年来, 我们采用上述方法进行多次预测, 准确率达 80% 以上, 即使误差, 也不超过 2 天, 取得较为满意的结果。

由图 1 可以看出, 在青蟹胚胎发育各阶段中, 原肠期的发育受温度的影响最为显著, 低温时发育时间明显延长。Wear^[9] 在几种不同蟹类, Margret^[6] 在兰蟹 *Callinectes sapidus* 均观察到胚胎发育中的类似现象, 他们称之为 滞育 (Diapause)。Wear^[9] 指出: 已进入滞育状态的胚胎其发育不会因水温升高而马上恢复。Margret^[6] 发现进入滞育状态的兰蟹胚胎呼吸率显著下降。他们均认为这种现象可能有其生态意义, 因为滞育现象的存在可使蟹类在环境水温过低时将幼体的孵化推迟至水温较为暖及时, 从而保证刚孵出的幼体有可资利用的饵料及适宜的环境温度。

根据实验结果, 青蟹胚胎发育的适宜温度大致在 20—30℃。这与厦门地区青蟹繁殖盛期海区水温基本一致。当温度自 20℃ 升至 30℃, 青蟹胚胎发育时间明显缩短, Q_{10} 值约为 2.9。Wild^[10] 曾报道一种黄道蟹 (*Cancer magister*) 胚胎发育的 Q_{10} 值约为 3, Wear^[9] 估计一种蟹 (*Macropipus deputator*) 每年 1 月 (平均水温 8℃) 第一次产卵时胚胎发育时间近 3 倍于 7 月份第二次产卵 (平均水温 15℃)。这些报道与本实验结果颇为一致。

Heasman & Fielder^[5] 和韦受庆等^[7] 曾分别提出青蟹胚胎发育全过程所需时间与温度的关系式。前者采用 Belehradch 关系式, 后者采用直线关系式。从作者的实验结果看, 采用 Belehradch 关系式更符合实际情况, 但我们回归所得的 α 及 a 、 b 值均与 Heasman & Fielder^[5] 的不同。其中我们算得的 α 值为 11.7℃, 这与我们实验中观察到的 10℃ 时胚胎 30 天仍停滞于 32 细胞期的结果相吻合, 而 Heasman & Fielder 的 α 值仅为 4.8℃。这些差异可能与 Heasman & Fielder 的实验条件以及他们对数据处理不够严格有关。他们的实验只是在 20.3—23℃ 这一极小的温度范围内进行, 回归时 25℃

及28℃下胚胎发育时间数据是分别借用Duplessis^[4]和Ong^[7]的结果,而且他们不是采用恒温孵育,水温数据取的是每天最高与最低温的平均值。所有这些都或多或少地影响他们所推算公式的准确性。由图2可以看到:由本实验结果所得的胚胎发育时间与水温的关系曲线介于Heasman & Fielder与韦受庆等之间,其中较高及较低温度段趋于Heasman & Fielder的结果,中间温度段则与韦受庆等较为接近。

诱导蟹类在非繁殖季节产卵及进行离体孵育的报道所见不多。Sulkin et al^[8]曾采用单纯提高水温的方法诱导兰蟹在冬季产卵,但成功率不高且历时较长,亲蟹所产卵也是散落于水槽底部未能形成正常卵块。Costlow et al^[1],陈弘成等^[2]与韦受庆等^[1]曾先后有过卵离体孵育的报道,但他们用于进行离体孵育的卵都是从抱在蟹腹部的卵块中取下来的少量卵串,且都使用往返式振荡器^[2,3]或孵化袋兼打气^[1]等不同的辅助设备来进行孵育。而我们则是采用切除亲蟹双侧眼柄以促使性腺激素分泌,结合模拟繁殖季节的水温条件,从内、外因并行诱导青蟹在非繁殖季节产卵,成功率高且耗时较短。在离体卵的实验中,我们则是采用散落在池底不能形成卵块的单个卵粒放在结晶皿中静置培养,亦能成功地孵出正常的幼体。这些技术方法简单,操作方便,在幼体实验生态研究中具有实际应用价值,使幼体实验生态研究不致于受到季节的限制。

参 考 文 献

- [1] 韦受庆、罗远裕, 1986, 青蟹胚胎发育的研究, 热带海洋, 5(3): 57—61。
- [2] 陈弘成、郑金华, 1985, 蟹苗人工培育之研究, I. 温度、盐度对卵孵化及蟹苗存活和成长之影响, 台湾水产学会刊, 12(2): 70—77。
- [3] Costlow, J. D. & Bookhout, C. G., 1960. A method for developing brachyura egg in vitro. Limnol. Oceanogr., 5: 212—215。
- [4] Duplessis, A., 1971. A preliminary investigation into the morphological characteristics, feeding, growth, reproduction and larval rearing of *Scylla serrata* (Forsk.) (Decapoda: Portunidae) held in captivity. Fisheries Development Corporation of South Africa. Unpublished manuscript. 24PP.
- [5] Heasman, M. P. & Fielder, D. F., 1983. Laboratory spawning and mass rearing of the mangrove crab *Scylla serrata* (Forsk.) from first zoea to first crad stage. Aquaculture, 34: 303—316。
- [6] Margret, O. A. & Robert, Y. G., 1984, The effect of temperature on the oxygen consumption and developmental rate of the embryos of *Callinectes sapidus* Rathbun. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 82(2—3): 221—231。
- [7] Ong, K. S. 1964. The early development stages of *Scylla serrata* Forskal (Crustacean, Portunidae), reared in the laboratory. Proc. Indo-Pacific Fish-Coun., 11(II): 135—146。
- [8] Sulkin, S. D., Branscomb, E. S. & Miller, R. E., 1976. Induced Winter spawning and culture of larvae of the blue Crab, *Callinectes sapidus* Rathbun. Aquaculture, 8: 103—113。
- [9] Wear, R. G., 1974. Incubation in British decapoda crustaceans, and the effects of temperature on the rate and success of embryonic development. J. Mar. Biol. Assoc. U. K., 54: 746—762。
- [10] Wild, P. W., 1980. Effects of seawater temperature on spawning, egg development, hatching success and population fluctuation of the Dungeness crab, *Cancer magister*; Calif. Coop. Oceanic Fish. Invest Rep., 21: 115—120。