

中华绒螯蟹受精卵离体培育的初步研究

鲍 鹰¹ 刘 军² 林少军³

(¹中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

(²辽宁省海洋水产研究所 大连 116000)

(³青岛牧海生物技术有限公司 266071)

提要 用实验生态学的方法对培养中华绒螯蟹离体胚胎的条件进行了研究。结果表明,温度不仅直接影响胚胎的发育速度,而且通过影响水中真菌的繁殖间接但明显地影响胚胎的存活率。光照对胚胎发育的影响不明显。在4~8℃的低温环境下,并且卵的密度不大于100粒/ml时充气与否对胚胎发育的影响也不明显。用0.05~0.1 mg/L的孔雀石绿,2~8 mg/L的亚甲基蓝,20~50 mg/L的福尔马林或3~5 ml/L的制霉菌素都能有效地抑制水中真菌的生长。在无真菌感染的情况下,能有效地在4~8℃保存离体河蟹胚胎60 d,孵化率达80%以上。

关键词 中华绒螯蟹,受精卵

梁象秋、赵乃刚、堵南山、薛鲁征等从70年代开始对中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)的生态、生理、繁殖等进行了大量的研究。近年来我国的河蟹养殖业发展迅猛,已建立起一整套从人工育苗到养成的生产技术,

形成了一个较大的养殖行业。随着河蟹育苗业的发

* 中国科学院海洋研究所研究报告第3580号;

收稿日期:1998-09-25;修回日期:1998-10-13

展,有关河蟹胚胎的离体培养引起了人们的关注。从1994年开始,刘学军、顾景玲、顾功超^[1]、李悦悦^[2]等对河蟹离体卵人工孵化进行了研究,这在育苗生产上是有意义的。在自然条件下河蟹从受精卵开始生长发育到性成熟需要两年时间。人工养殖时有两种模式:一是用早苗当年养成较小规格的商品蟹;二是用晚苗当年养成扣蟹,第二年从扣蟹养成大规格的商品蟹。当采用第二种模式时,在7~9月份育苗最为理想,但是由于水温的自然升高,蟹卵最迟到6月份已经全部孵出。成苗过早一则培育扣蟹的时间长,生产费用高,二则需要人为地控制幼蟹的生长,以防扣蟹在秋后性成熟。因此有必要对延迟河蟹卵发育的方法进行研究。用低温来延迟河蟹卵的发育是最简单直接的方法,这又有两种途径:一是用低温水来饲养亲蟹,二是在低温环境中保存离体的受精卵并进行人工孵化。本实验从后者出发,观察了水温、消毒方法、充气、光照等因素对河蟹离体卵培育的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

抱卵亲蟹于1997年2月取自江苏省赣榆县的河蟹育苗场,蟹体色泽正常,健康。取回的当天即对材料进行处理。将抱卵亲蟹用 200×10^{-6} 的福尔马林进行体表消毒,受精卵连附肢剪下,放在冰盘上待用。取少量受精卵镜检发育状况。

1.2 实验方法

1.2.1 控温培养箱用家用冷藏箱改制,控温范围是 $0 \sim 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

1.2.2 河蟹胚胎冷藏时间与孵化率的关系 实验共设3个大组,其中2组为离体卵,1组为抱卵亲蟹,作为对照,见表1。每大组中设4小组,每小组有4个重复。离体卵保存在300 ml三角烧瓶中,抱卵亲蟹养在 $50 \text{ cm} \times 25 \text{ cm} \times 15 \text{ cm}$ 的塑料盆中。每5 d更换一次同温度的新鲜海水。分别在冷藏开始后的第5,15,30,45和60天从各样品中取100粒卵放入100 ml三角烧瓶中,注入与冷藏温度相同的过滤海水,盐度为28,pH为8.1,不充气。以后每天换水50%、升温 $1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 。到 $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 后不再升温,直至幼体孵出,计算其孵化率作为卵的质量指标。蚤状幼体在计数后不再培养。

1.2.3 药物对培育水中真菌的抑制 选择孔雀石绿、亚甲基蓝、福尔马林和制霉菌素作为水中真菌的抑制物。药物浓度见表2。每种处理设2个重复。每个样品有200粒离体卵,保存在300 ml含药物的三角烧

瓶中冷藏60 d,冷藏温度为 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 。第61天开始升温,每天 $1 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 后不再升温,直至幼体孵出,计算其孵化率。其间每5 d更换一次同温度同药物浓度的新鲜海水。因蟹卵的密度很小,故不充气。

2 结果与讨论

2.1 对每一大组的每次孵化率进行差异显著性检验,见表3。

由于所有的 $F_{\text{值}}$ 均小 $F(3,12)=5.95$,($\alpha=0.05$),所以充气与光照在本实验条件下对胚胎的存活和孵化没有明显的影响。

表1 河蟹受精卵冷藏实验设计

Tab. 1 The preservation condition of invitro embryo of mitten crab

组别	冷藏状态	冷藏温度 ($^{\circ}\text{C}$)	充气	光照
1-1	离体卵	4	+	+
1-2			+	-
1-3			-	+
1-4			-	-
2-1	离体卵	8	+	+
2-2			+	-
2-3			-	+
2-4			-	-
3-1	抱卵母蟹	4	+	+
3-2			+	-
3-3			-	+
3-4			-	-

注:“+”表示有;“-”表示无。

表2 药物的浓度设置

Tab. 2 The concentration of medicines

药品名称	药物浓度 (mg/L)				
孔雀石绿	0.005	0.02	0.1	0.5	1
亚甲基蓝	0.1	0.5	2	10	50
福尔马林	5	20	50	100	200
制霉菌素	0.05	1	5	10	20

表3 孵化率的差异显著性检验($F_{\text{值}}$)

Tab. 3 The test of diversity of hatching rate

温度 ($^{\circ}\text{C}$)	时间(d)				
	5	15	30	45	60
$4 \text{ }^{\circ}\text{C}$	1.99	1.22	2.36	1.98	3.31
$8 \text{ }^{\circ}\text{C}$	3.19	4.91	4.29	2.03	0.99
对照	0.18	0.75	1.48	0.62	0.70

$F(3,12)=5.95$, $\alpha=0.05$

2.2 在 $4 \sim 8 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷藏条件下河蟹胚胎能够离体存活至少60 d。

从图1可以看出保存期15 d之内卵的孵化率大多在80%以上,15 d以后由于真菌感染,部分卵死亡,孵化率逐渐下降。对照组的附体卵由于受到亲蟹的保护,未受真菌的侵袭,孵化率始终在80%以上。因此离体卵存活率的高低主要受水中真菌的影响。在 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$

条件下保存胚胎的效果要比在8℃时好,这主要是因为温度越高真菌的污染越严重。一个有趣的现象是亲蟹能保护胚胎免受真菌的侵袭。这是一个很值得深入研究的问题。目前在河蟹育苗中防治真菌的唯一有效的方法是使用药物,但是长期使用药物会引起幼体体质弱,影响养成期的存活率。另外会使真菌具有抗药性,从而引发更加严重的病害。如何防止真菌对离体胚胎的侵袭,是河蟹胚胎离体培养技术用于河蟹育苗

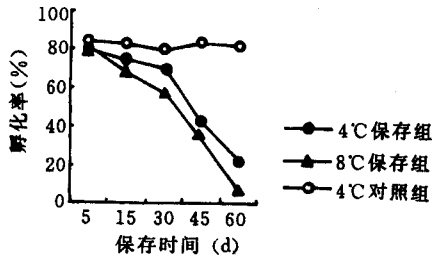


图1 3个保存组孵化率的比较

Fig. 1 The comparison of hatching rate to three preservation conditions

生产的一个关键问题。

2.3 0.02 mg/L 以上浓度的孔雀石绿能够有效抑制真菌的生长,但孔雀石绿的浓度高于0.2 mg/L 时会对河蟹胚胎产生毒性,使胚胎死亡或者虽能孵化但幼体很快死亡。因此孔雀石绿的最佳用量是0.05~0.1 mg/L(见图2)。

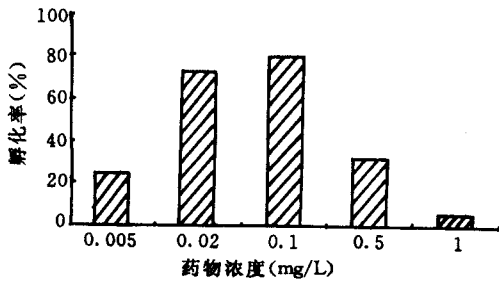


图2 孔雀石绿与孵化率的关系

Fig. 2 The response of hatching rate to Malachite green

2.4 亚甲基蓝对河蟹胚胎的安全性比较高,2 mg/L 以上的浓度就能明显的抑制真菌的生长,最佳使用浓度为2~8 mg/L,浓度再高则会对胚胎产生毒性(见图3)。

2.5 福尔马林也能抑制真菌的生长,但是要浓
1999年第1期

度高达20~50 mg/L时才起作用(见图4)。福尔马林与孔雀石绿联用比其单独使用的效果要好得多,联用时福尔马林为15 mg/L,孔雀石绿为50 mg/L。

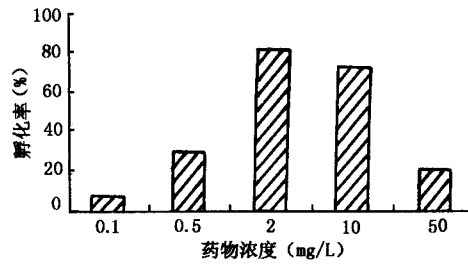


图3 亚甲基蓝与孵化率的关系

Fig. 3 The response of hatching rate to Methylene blue

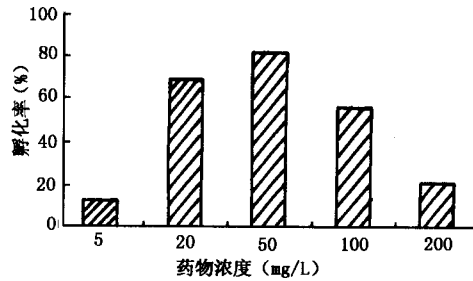


图4 福尔马林与孵化率的关系

Fig. 4 The response of hatching rate to Formalin

2.6 制霉菌素对胚胎的毒性比较小,用3~5 mg/L的制霉菌素能有效地解决离体卵被真菌感染的问题(见图5)。

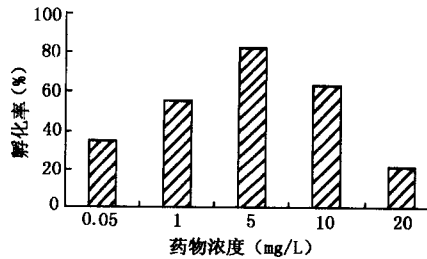


图5 制霉菌素与孵化率的关系

Fig. 5 The response of hatching rate to Nyffungini

参考文献

- 1 顾功超、黄旭雄等. 渔业机械仪器, 1995, 22(5): 11~14
- 2 李悦悦、林云萍等. 水产科技情报, 1998, 25(2): 77~81

STUDY ON THE BREEDING OF INVITRO EMBRYO OF MITTEN CRAB(*Eriocheir sinensis*)

BAO Ying¹ LIU Jun² LIN Shao-jun³

(¹*Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071*)

(²*Institute of Liaoning Marine Fisheries, Dalian 116000*)

(³*Qingdao Mushi Biotechnology Co., Ltd. 266071*)

Received: Sep. 25, 1998

Key Words: Mitten crab, Invitro embryo, Hatch, Fungus disease

Abstract

For the breeding of invitro embryo of mitten crab *Eriocheir sinensis*, the temperature of water plays an important part. It affect not only on the development of embryo, but also on the rate of reproduction of fungus, which will cause a decline in the survival rate of embryo. Illumination doesn't affect obviously on the development of the embryo. When the density of the eggs is low while the temperature is 4 °C, aeration isn't essential. Affected by just the right amount of Formalin, Malachite green, Nyffungini and Methylene blue, the fungus will grow very slowly and the embryos will keep fit. But large amount of medicines will kill the embryos. The invitro embryos will keep high hatching rate (80 %) for at least 60 days under 4 °C while they are prevented from the fungus infection.