

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20220319001

http://www.yykxjz.cn/

贺露露, 耿智, 黄晓荣, 冯广朋, 庄平, 赵峰, 张涛, 杨刚. 盐度对中华绒螯蟹交配及产卵前后血淋巴中5种激素的影响研究. 渔业科学进展, 2023, 44(5): 162-171

HE L L, GENG Z, HUANG X R, FENG G P, ZHUANG P, ZHAO F, ZHANG T, YANG G. Effects of salinity on five hormones in the hemolymph of *Eriocheir sinensis* before and after mating and spawning. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(5): 162-171

## 盐度对中华绒螯蟹交配及产卵前后 血淋巴中5种激素的影响研究\*

贺露露<sup>1,2</sup> 耿智<sup>1,3</sup> 黄晓荣<sup>1,2,3①</sup> 冯广朋<sup>1,2,3</sup> 庄平<sup>1,2,3</sup>  
赵峰<sup>1,2,3</sup> 张涛<sup>1,2,3</sup> 杨刚<sup>1,3</sup>

(1. 中国水产科学研究院东海水产研究所 农业农村部东海与远洋渔业资源开发利用重点实验室 上海 200090; 2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306;  
3. 上海长江口渔业资源增殖和生态修复工程技术研究中心 上海 200090)

**摘要** 为探究盐度在中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)交配和产卵前后对血淋巴中5种激素的影响,本研究分别设置了0、2、4、6的交配盐度和3、6、9、12、15、18、21的产卵盐度,分析了不同交配和产卵盐度条件下,中华绒螯蟹血淋巴中双羟基孕酮(DHP)、促性腺激素(GTH)、前列腺素(PG)、雌二醇(E<sub>2</sub>)和睾酮的含量变化。结果显示,在淡水中,雌蟹无交配行为发生,当盐度<6时,雌蟹只交配不产卵。雌蟹在盐度为2~6中交配后,血淋巴中GTH、PG、E<sub>2</sub>和睾酮与交配前相比均无明显变化,且交配后各盐度组相比无显著差异( $P>0.05$ )。随着盐度的升高,雌蟹产卵前,血淋巴中DHP、PG、E<sub>2</sub>和睾酮的含量均呈先下降再上升的趋势;产卵后血淋巴中DHP、PG、E<sub>2</sub>则呈先上升后下降的趋势,其中,当盐度为18时,雌蟹产卵后,血淋巴中DHP、GTH、PG、E<sub>2</sub>和睾酮含量均降到最低,且与产卵前相比均有显著差异( $P<0.05$ )。当盐度为6时,雌蟹产卵前血淋巴中DHP、PG、E<sub>2</sub>和睾酮含量最高,产卵后DHP和PG的含量下降,而GTH、E<sub>2</sub>和睾酮含量均呈上升趋势,但产卵前与产卵后相比除DHP有显著差异外( $P<0.05$ ),其他各项指标相比均无显著差异( $P>0.05$ );此后,随着盐度的逐渐升高,产卵前后血淋巴中睾酮的含量呈先下降后上升的趋势。研究表明,盐度对中华绒螯蟹雌蟹交配和产卵前后血淋巴中5种激素产生了一定影响,其中,5种激素在中华绒螯蟹低盐度交配中的变化不显著,DHP、GTH和PG这3种激素参与了中华绒螯蟹的产卵活动。本研究通过探讨盐度对中华绒螯蟹雌蟹交配及产卵前后血淋巴中激素的影响,旨在了解中华绒螯蟹繁殖的生理机制,为中华绒螯蟹的繁育生物学研究提供基础资料和参考。

**关键词** 盐度; 中华绒螯蟹; 交配; 产卵; 激素

**中图分类号** S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2023)05-0162-10

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)广泛分布于我国沿海及通海的水域中,具有重要的经济效益(王武等,

\* 国家重点研发计划(2018YFD0900903)、上海市中华绒螯蟹现代农业产业技术体系项目(沪农科产字 2017-4 号)、国家自然科学基金(31972795)、中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2020TD13)和国家科技资源共享服务平台共同资助。贺露露, E-mail: 2191473839@qq.com

① 通信作者: 黄晓荣, 副研究员, E-mail: hxr828@126.com

收稿日期: 2022-03-19, 收修改稿日期: 2022-05-05

2013)。中华绒螯蟹具有降海洄游和溯河洄游 2 种生活习性, 在秋季时, 性成熟个体洄游到近海河口交配产卵, 至翌年春季时, 大眼幼体溯河而上, 回到淡水水域中继续生长(堵南山, 2004)。盐度是影响中华绒螯蟹交配和产卵的关键因子, 目前, 有关盐度对蟹类影响的报道主要集中在渗透压调节(Onken *et al.*, 1999; Gabriela *et al.*, 2007)、营养代谢(王瑞芳, 2012)与能量代谢(Luvizotto-Santos *et al.*, 2003)、退壳与性早熟研究(潘颖, 2018)等方面, 但盐度对中华绒螯蟹亲蟹交配及产卵前后血淋巴中相关激素的影响研究尚未见报道。

Fostier 等(1975)提出了类固醇激素包括孕酮、 $17\alpha$ -双羟孕酮、 $20\beta$ -双羟孕酮和  $17\alpha$ - $20\beta$ -双羟孕酮(dihydroxyprogesterone, DHP)等, 其中, 最有效地诱导鲑鳟鱼类卵细胞成熟的是 DHP, 已在大西洋鲑(*Salmo salar*)、太平洋鲑(*Oncorhynchus*)、虹鳟(*Salmo gairdneri*)和紅大麻哈鱼(*Oncorhynchus keta*)等鱼类中得到证实(Zhao *et al.*, 1985; Idler, 1960)。促性腺激素(gonadotropin, GTH)是由脑垂体分泌作为一种诱导卵母细胞最后成熟的因子。早期研究表明, 硬骨鱼类的排卵活动与血液中的 GTH 水平密切相关(Goetz, 1983)。前列腺素(prostaglandin, PG)是一类具有生理活性的不饱和脂肪酸, 具有极其广泛而复杂的生物学作用(周定刚等, 2004)。其中, 前列腺素 E (PGE)、前列腺素 F (PGF)和前列环素(PGI<sub>2</sub>)均可促进鱼类和甲壳动物排卵。雌二醇(estradiol, E<sub>2</sub>)是甲壳动物体内最重要的活性雌激素, 在卵巢发育和卵黄发生过程中起着十分重要的作用。姜仁良等(1992)推测, 诱导中华绒螯蟹性腺发育可能是 E<sub>2</sub> 和甾体激素的共同作用。Burns 等(1984)在美国龙虾(*Homarus americanus*)雄体性腺和血淋巴中均发现了睾酮(testosterone), 并认为甲壳动物体内也具有 E<sub>2</sub> 和睾酮, 且对性腺发育有一定的影响。

本研究通过分析不同盐度条件下, 中华绒螯蟹雌体交配及产卵前后血淋巴中相关激素的含量变化特征, 旨在解析盐度对中华绒螯蟹交配及产卵的生理机制, 为中华绒螯蟹的繁育生物学研究提供基础资料和参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

实验所用亲蟹来自江苏省高邮湖养殖场, 挑选四肢健全、活力好的雌蟹[(111.48±20.86) g] 240 只、雄蟹[(125.84±8.10) g] 120 只, 共 360 只, 运至中国水产科学研究院东海水产研究所实验室。雌雄蟹分别放

置于 4 个淡水玻璃缸中(直径为 1.8 m, 高为 0.8 m, 保持水深为 50 cm), 暂养 7 d 后用于正式实验。每缸中蟹的总重量基本保持一致, 每日 09:00 按照 3%~5% 体重投喂新鲜去壳缢蛭(*Sinonovacula constricta*), 每天清除残饵和死亡个体。实验期间, 保持自然光照和自然水温[(11.50±3.16) °C], pH 为 7.5~8.5, 溶解氧(DO)保持在(6.0±0.3) mg/L 以上。

### 1.2 交配、产卵实验

**1.2.1 交配实验** 配制盐度分别为 0、2、4 和 6 的水体用于交配实验, 每个盐度设 3 个平行。实验时, 从暂养水槽中各取雌蟹 10 只、雄蟹 5 只, 置于事先配制好的不同盐度水槽中(直径为 1.0 m, 高为 0.6 m), 池中水深为 25 cm。交配实验前, 在盐度分别为 0、2、4 和 6 实验组中, 每只雄蟹的甲壳上均进行数字标记和荧光标记的双重标记, 通过视频摄像系统对交配行为和交配过程进行全程跟踪和摄像, 确保取样的准确性。待实验结束后, 将所有盐度组剩余的雌蟹全部解剖, 若雌体纳精囊中含有精荚, 即可确定雌体交配成功。

**1.2.2 产卵实验** 根据本实验室在长江口长期调查和监测中华绒螯蟹产卵蟹的盐度分布的结果(0~21), 同时, 为了验证盐度为 9 是否为产卵的下限, 产卵实验设置盐度梯度分别为 3、6、9、12、15、18 和 21(交配率及产卵率实验结果待发表)。实验时, 从暂养水槽中各取雌蟹 10 只、雄蟹 5 只, 置于事先配制好的不同盐度水槽中(直径为 1.0 m, 高为 0.6 m), 池中水深为 25 cm。同时, 所有盐度分别设置 1 个正常养殖组, 每缸中放 10 只雌蟹, 每个盐度设 3 个平行。

**1.2.3 饲养条件** 每天 09:00 在每缸中投喂去壳缢蛭, 饵料量为蟹体重的 3%~5%, 同时, 清除水中的残饵, 换水依据当天水质而定, 换水量为 1/2~2/3, 保持水质干净。每天 4 次记录各实验组的交配情况、水温和盐度, 记录时间为 08:00、12:00、16:00 和 20:00, 水体盐度根据实测情况进行校准, 使盐度控制在±0.2 的范围内。实验期间, 保持自然光照和自然水温, 水温为(11.50±3.16) °C, pH 为 7.5~8.5, DO>(6.0±0.3) mg/L。

### 1.3 血淋巴采集

交配实验持续 20 d。20 d 后, 从交配实验的各盐度组中取 5 只交配但未产卵蟹(盐度为 6)和未交配蟹(盐度为 0)进行血淋巴采集; 在产卵实验中, 若观察到实验组某个盐度中雌蟹已经产卵, 从该盐度中取 5 只实验组产卵蟹和 5 只正常养殖组产卵蟹分别进行

血淋巴采集。

采样时,将蟹在冰水中麻醉 15 min,捞出后吸干表面水分,采用 2 mL 一次性无菌注射器从第 3 或第 4 步足基部关节处采集血淋巴,采集的血淋巴快速注入已提前加入乙二胺四乙酸二钾(EDTA-2K)抗凝剂的 1.5 mL 无菌离心管中,实验全程在冰上进行;将采集的样品震荡摇匀,4 °C 条件下,4 000 r/min 离心 10 min 后,倒出上清液,再重复离心 1 次,合并上清液,然后放入-80 °C 冰箱中保存备用。

#### 1.4 激素检测指标及测定方法

血淋巴检测指标包括 DHP、GTH、PG、E<sub>2</sub> 和睾酮。5 种激素含量测定均采用双抗体夹心法,试剂盒全部由青岛科创检测有限公司提供,测定方法按照试剂盒操作步骤进行,使用酶标仪(华东电子 DG5033A)在 450 nm 波长下测定吸光度(OD 值),通过标准曲线计算样品中激素浓度。DHP 和 GTH 单位为 ng/L,PG 单位为 ng/mL,E<sub>2</sub> 单位为 pmol/L,睾酮单位为 nmol/L。

#### 1.5 数据处理

采用 Origin 软件进行数据输入和绘图,实验数据使用平均值±标准差(Mean±SD)表示,采用 SPSS 11.5 软件进行统计分析,使用 Levene 法进行方差齐性检验,当不满足齐性方差时,对百分比数据进行反正弦或者平方根处理,对实验结果采用单因素方差分析(one-way ANOVA),采用 Tukey's 法进行多重比较, $P < 0.05$  为差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 雌蟹交配及产卵前后血淋巴中 DHP 含量的变化

雌蟹在低盐度条件下交配后,其血淋巴中 DHP 含量的变化见图 1。从图 1 可以看出,在淡水中,雌蟹血淋巴中的 DHP 含量最高,平均为(51.31±5.47) ng/L;随着盐度的升高,血淋巴中 DHP 含量呈下降的趋势,除盐度为 2 外,其他各盐度组相比均无显著差异( $P > 0.05$ )。

不同盐度条件下,雌蟹产卵前后血淋巴中 DHP 的变化见图 2。从图 2 可以看出,在盐度为 6、12 和 18 时,雌蟹产卵结束后,血淋巴中的 DHP 有不同程度的降低,与此同时,在盐度为 9、15 和 21 时,产卵后血淋巴中 DHP 含量比产卵前有所上升,与产卵后其他各盐度组比较,盐度为 18 时,雌蟹产卵后,血淋巴中 DHP 含量最低( $P < 0.05$ ),平均值为(26.09±6.94) ng/L。

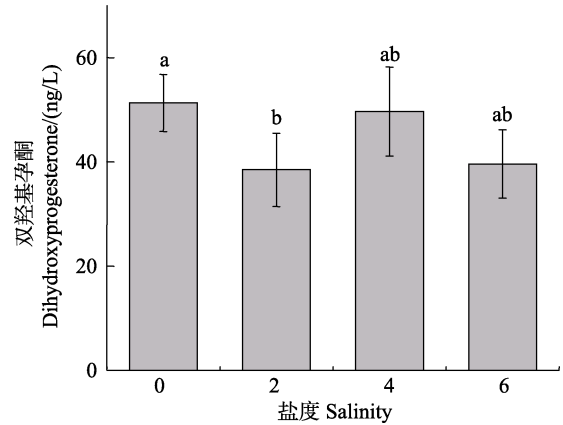


图 1 不同盐度下雌蟹交配后 DHP 含量的变化  
Fig.1 Changes of DHP content in female crab after mating at different salinities

不同字母代表不同盐度组间存在显著差异( $P < 0.05$ )。

图 3、图 5、图 7 和图 9 同。

Different letters represent the significant difference between different salinity groups ( $P < 0.05$ ).

The same in Fig.3, Fig.5, Fig.7, and Fig.9.

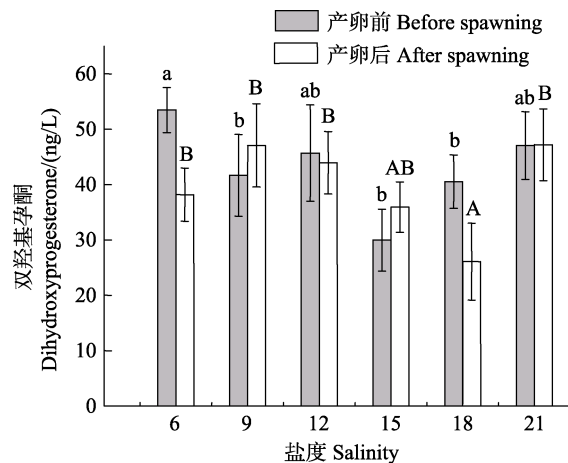


图 2 盐度对雌蟹产卵前后 DHP 含量的影响

Fig.2 Effects of salinity on DHP content of female crab before and after spawning

不同小写字母表示雌蟹产卵前存在显著差异,不同大写字母表示雌蟹产卵后存在显著差异( $P < 0.05$ )。

图 4、图 6、图 8、图 10 同

Different small letters represent the significant difference between female crabs before spawning, and different capital letters represent the significant difference between female crabs after spawning ( $P < 0.05$ ).

The same in Fig.4, Fig.6, Fig.8, and Fig.10.

### 2.2 雌蟹交配及产卵前后血淋巴中 GTH 含量的变化

雌蟹在低盐度条件下,交配后血淋巴中 GTH 的含量变化见图 3。由图 3 可知,在不同盐度水体中,雌蟹交配后血淋巴中 GTH 含量相比无显著差异( $P > 0.05$ )。

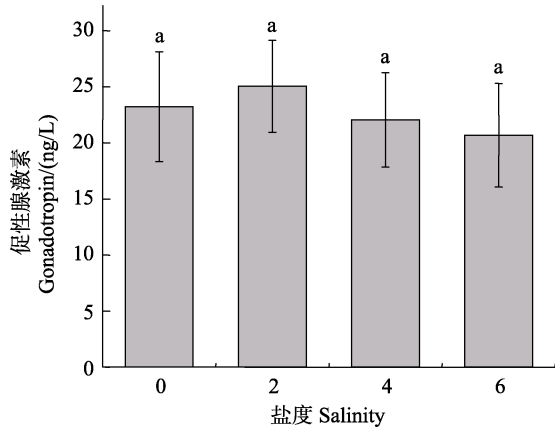


图 3 不同盐度下雌蟹交配后 GTH 含量的变化  
Fig.3 Changes of GTH content in female crab after mating at different salinities

雌蟹在不同盐度条件下,产卵前后血淋巴中 GTH 的变化见图 4。从图 4 可以看出,在盐度为 6 和 15 的水体中,雌蟹产卵后,血淋巴中 GTH 含量均有所升高,但在盐度为 9、12、18 和 21 时,产卵后 GTH 含量均降低,但产卵后各盐度组 GTH 含量相比均无显著差异( $P>0.05$ )。

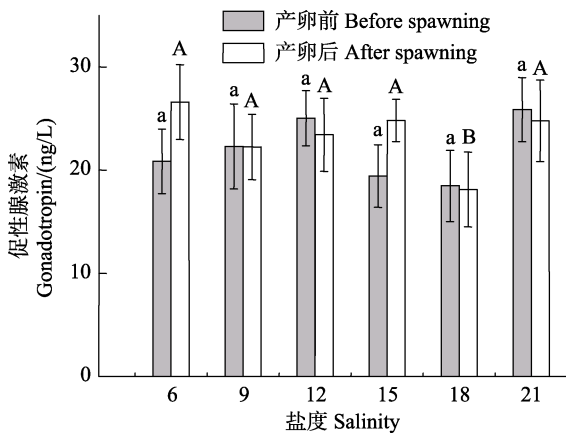


图 4 盐度对雌蟹产卵前后 GTH 含量的影响  
Fig.4 Effects of salinity on GTH content of female crab before and after spawning

### 2.3 雌蟹交配及产卵前后血淋巴 PG 含量的变化

雌蟹在低盐度条件下交配后,血淋巴中 PG 的含量变化见图 5。从图 5 可以看出,不同盐度条件下雌蟹交配后,血淋巴中 PG 含量相比无显著差异( $P>0.05$ )。

雌蟹在不同盐度条件下,产卵前后血淋巴中 PG 含量的变化见图 6。从图 6 可以看出,当水体中盐度为 6 和 18 时,雌蟹产卵后血淋巴中 PG 含量与产卵前相比有所下降,且在盐度为 6 时,雌蟹产卵后血淋巴中 PG 含量与产卵前相比无显著差异( $P>0.05$ );而

在盐度为 9、12、15 和 21 时,产卵后血淋巴中 PG 含量呈上升趋势,但产卵前后各盐度组相比均无显著差异( $P>0.05$ )。产卵后,盐度为 12 中的雌蟹,其血淋巴中 PG 含量最高,平均为(274.30±37.58) ng/mL。

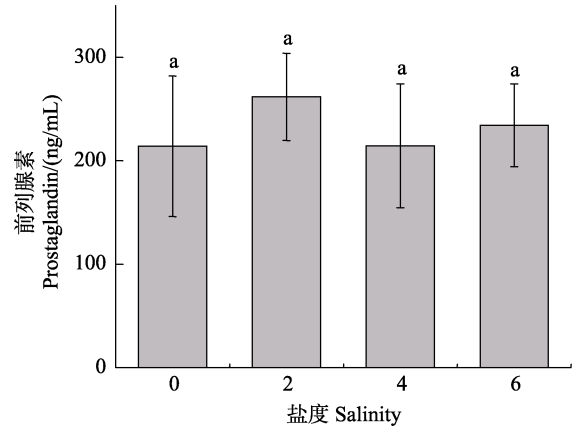


图 5 不同盐度下雌蟹交配后 PG 含量的变化  
Fig.5 Changes of PG content in female crab after mating at different salinities

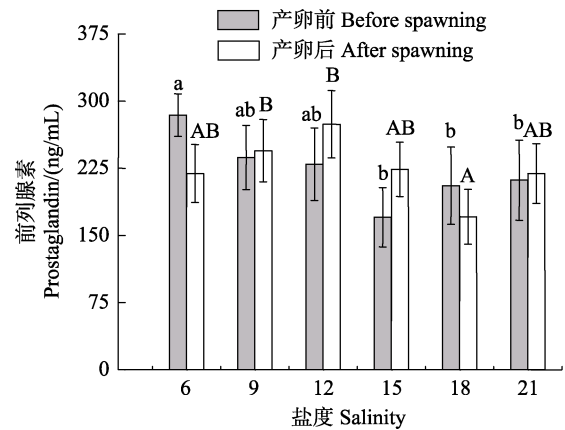


图 6 盐度对雌蟹产卵前后 PG 含量的影响  
Fig.6 Effects of salinity on PG content of female crab before and after spawning

### 2.4 雌蟹交配及产卵前后血淋巴中 E<sub>2</sub> 含量的变化

雌蟹在低盐度条件下交配后,血淋巴中 E<sub>2</sub> 含量的变化见图 7。从图 7 可以看出,在不同的盐度中,雌蟹血淋巴中 E<sub>2</sub> 含量相比无显著差异( $P>0.05$ )。

雌蟹在不同盐度条件下,产卵前后血淋巴中 E<sub>2</sub> 的含量变化见图 8。在盐度为 9 和 18 时,雌蟹产卵后血淋巴中 E<sub>2</sub> 含量降低,但其他盐度组中,产卵后 E<sub>2</sub> 含量均升高,其中,在盐度为 15 的水体中,雌蟹产卵后血淋巴中的 E<sub>2</sub> 含量显著升高( $P<0.05$ )。

### 2.5 雌蟹交配及产卵前后血淋巴中睾酮含量的变化

雌蟹在低盐度下交配后,血淋巴中睾酮含量变化

见图9。从图9可以看出,淡水中,雌蟹血淋巴中睾酮含量最低,平均为(16.82±1.02) nmol/L;随着盐度的升高,睾酮含量也逐渐升高,但各盐度组相比均无显著差异( $P>0.05$ )。

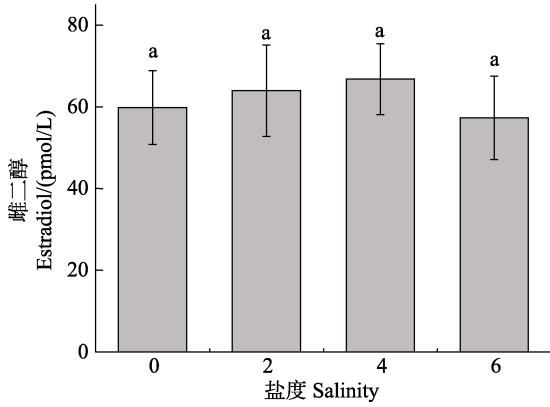


图7 不同盐度下雌蟹交配后E<sub>2</sub>含量的变化  
Fig.7 Changes of E<sub>2</sub> content in female crab after mating at different salinities

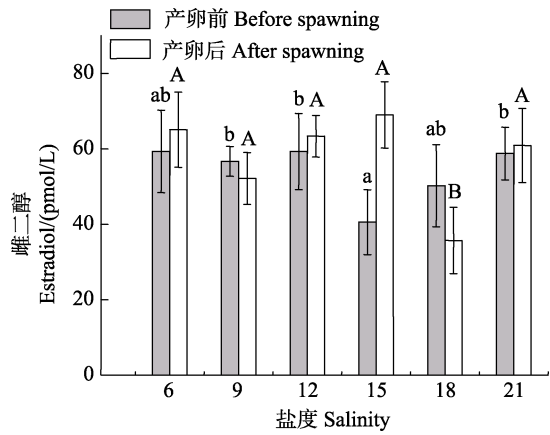


图8 盐度对雌蟹产卵前后E<sub>2</sub>含量的影响  
Fig.8 Effects of salinity on E<sub>2</sub> content of female crab before and after spawning

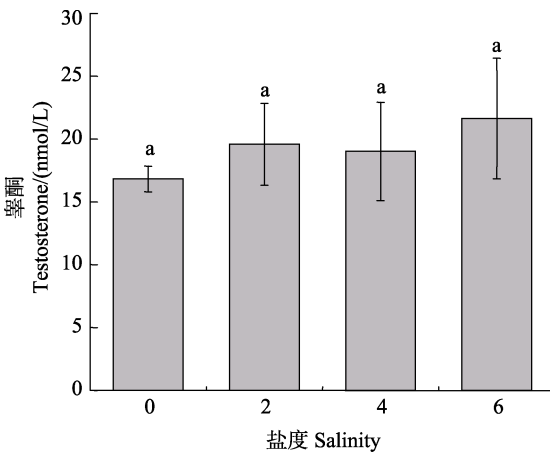


图9 不同盐度下雌蟹交配后睾酮含量的变化  
Fig.9 Changes of testosterone content in female crab after mating at different salinities

雌蟹在不同盐度条件下,产卵前后血淋巴中睾酮含量的变化见图10。从图10可以看出,除盐度为18时,雌蟹产卵后血淋巴中睾酮含量下降外,其他盐度组均呈上升趋势;当盐度为6时,产卵前和产卵后血淋巴中的睾酮含量为最高,平均值分别为(21.68±3.25)和(23.21±0.86) nmol/L,但二者相比无显著差异( $P>0.05$ )。

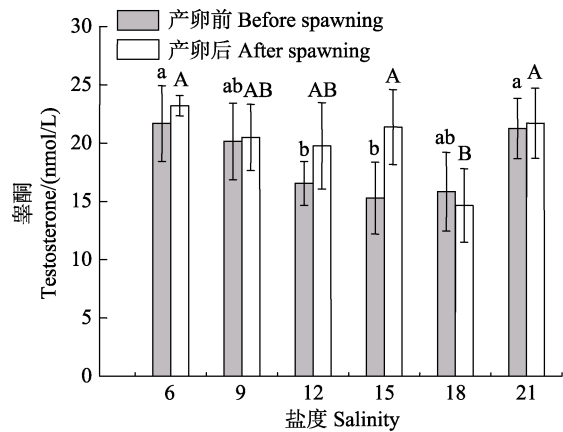


图10 盐度对雌蟹产卵前后睾酮含量的影响  
Fig.10 Effects of salinity on testosterone content of female crab before and after spawning

### 3 讨论

#### 3.1 盐度对产卵过程中的中华绒螯蟹血淋巴中DHP、GTH和PG的影响

在诱发鲢鳙鱼类卵细胞成熟过程中, DHP起了主导作用(林浩然, 1982)。赵维信(1987)研究发现,在鱼类卵细胞成熟后期且排卵开始时, DHP会形成一个峰值诱导卵巢滤泡成熟、卵核消失。Kraak等(1984)研究也表明,虹鳟在卵核消失时, DHP会持续上升进而保持在高水平上。这些研究都表明, DHP能直接作用于卵母细胞,诱发卵母细胞最终成熟,导致卵核消失并排卵。Scott等(1983)研究了有关鱼类卵母细胞的成熟机理,发现当鱼类卵母细胞在最后成熟时, 17 $\alpha$ -羟基孕酮(17 $\alpha$ -OHP)在 20 $\beta$ -类固醇脱羟酶(20 $\beta$ -HSD)作用下, DHP诱导卵母细胞胚泡破裂(geminal vesicle breakdown, GVBD)的发生,表明 DHP是诱导鱼类卵母细胞最后成熟的一种有效的性类固醇激素。在日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)(吴善, 1997;柳凌等, 2005)和花鳗鲡(*Anguilla marmorata*)(林静, 2015)人工诱导排卵研究中,使用 DHP进行催产,取得了显著的效果,认为 DHP在鳗鲡的排卵和产卵过程中起着非常重要的作用。本研究中,在盐度为6、12和18时,雌蟹产卵后血淋巴中 DHP含量降低,这与以上研究结果

相一致, 而其他盐度组却有所上升, 分析原因可能是雌蟹正处于二次产卵前期, 此时, DHP 有所增加, 为后续排卵做准备。同时, 雌蟹盐度为 0 (淡水) 时无交配行为发生, 在盐度低于 6 的水体中可以交配但不能产卵, 其血淋巴中 DHP 含量呈下降趋势, 尤其在盐度为 2 时, 出现明显降低, 可能是雌蟹交配后体内的营养物质大部分转移到卵巢中, 体内因缺少某种营养物质导致 DHP 合成受阻。

GTH 是硬骨鱼类脑垂体分泌在其生殖周期调节中起重要作用的激素。鱼类中存在 2 种典型的 GTHs, 即促卵泡激素(GTH-I)和促黄体素(GTH-II)。鱼类卵母细胞最终成熟标志是卵泡破裂, 只有达到最后的生理成熟, 卵母细胞才能正常排卵、受精。在这个过程中, 必须借助 GTH 刺激生殖细胞的生长、发育、成熟、排精及排卵(Otsu, 1963; Yano *et al.*, 1988)。虹鳟在临近卵子成熟时, 血淋巴中 GTH-II 含量持续上升, 然后稳定在高水平直到排出的卵全部产出(Fostier *et al.*, 1978), 以上研究都表明了 GTH 在鱼类排卵中起着重要作用。一般而言, 鱼类排卵效应的时间与血淋巴中 GTH 峰值出现的时间保持一致(Aide, 1988)。曲维良等(1986)采用脑垂体 GTH 诱导鱼类卵细胞的成熟是通过中介物质性类固醇激素在发挥作用, 在 DHP 对卵细胞发挥作用前, 必须借助于 GTH 的激发才能诱导排卵。同时, 有学者研究发现, GTH 也可以诱发大西洋鲑和虹鳟的卵巢滤泡产生 DHP, 直至卵核消失(Fostier *et al.*, 1978)。Jalabert 等(1977)采用放射免疫法测定了鲤(*Cyprinus carpio*)在注射脑垂体后, 血液中 GTH 明显升高, 之后再注入 DHP, 可使鲤顺利产卵。本研究中, 雌蟹产卵后, 血淋巴中 DHP 和 GTH 变化趋势基本一致, 表明在中华绒螯蟹雌蟹的排卵过程中, DHP 同样需要 GTH 的参与共同发挥排卵作用。

PG 在水产动物中均有广泛分布, 有 A、B、C、D、E、F、G、H 和 I 等多种类型。邢金宝等(2019)研究表明, 它可以促进性腺发育、帮助排卵, 且与繁殖能力息息相关。Nagaraju 等(2004)研究了 PG (PGF2 $\alpha$ , PGE2 和 PGD2)存在于色拉淡水蟹(*Oziotelphusa senex senex*)组织中, 并可以促进蟹类的卵巢发育, 且与生物的繁殖能力有关。Meunpol 等(2010)研究发现, 雌虾的卵巢和血淋巴中, PGE2 水平随着卵巢发育阶段的不同而波动, 且 PGE2 可以明显加快卵母细胞的生长。对溪红点鲑(*Salvelinus fontinalis*)而言, PGE2 既可促进也可抑制其排卵, 这主要取决于雌性个体(Goetz, 1983)。具有卵生、体外受精生殖方式的金鱼

(*Carassius auratus*), 它的性行为是由类固醇激素所刺激引起的, 而产卵行为则由 PG 刺激引起的, 且该激素引起的性行为或产卵行为仅局限在排卵后(赵维信, 1986)。本研究中, 不同盐度条件下, 雌蟹交配后, 血淋巴中 PG 含量无明显变化, 表明 PG 含量对雌蟹交配作用不显著。与其他鱼类、哺乳类动物相比, 除盐度为 15 外, 其他盐度中华绒螯蟹雌蟹排卵前后血淋巴中 PG 含量差异不显著, 原因可能是在不同的生物体中前列腺素对生物体的排卵作用有所差别。

黄金鲈(*Perca flavescens*)的卵泡在 DHP 刺激下生成大量 PGE2 和 PGF2 $\alpha$ , 并产生排卵效应(Berndtson, 1989)。本研究中, 雌蟹在盐度为 18 时, 产卵结束后, 血淋巴中 GTH、DHP 和 PG 含量显著减少( $P < 0.05$ ), 原因可能是在盐度为 18 的水体中, 雌蟹的产卵量、生殖力和生殖指数等繁殖性能参数均达到最大(本部分研究结果待发表), 且这 3 种激素变化趋势基本一致, 表明在中华绒螯蟹体内, 这 3 种激素可能存在相互作用, 它们之间的关系可能是 GTH 首先作用于 DHP, DHP 再刺激 PG, 从而产生排卵效应。而在其他盐度中, 雌蟹产卵结束后, 血淋巴中 DHP 和 GTH 略有上升, 原因是雌蟹产卵并未全部完成, 此时, 可能处于二次产卵前期, 导致这 2 种激素呈现升高的趋势。

### 3.2 盐度对中华绒螯蟹血淋巴中 E<sub>2</sub> 和睾酮含量的影响

魏薇等(2007)对不同蜕皮周期中华绒螯蟹血淋巴中 E<sub>2</sub> 和睾酮的含量进行了研究, 发现中华绒螯蟹血淋巴中 E<sub>2</sub> 含量的上升与盐度有关, 且高盐度时, 中华绒螯蟹血淋巴中 E<sub>2</sub> 含量的升高能促进性腺发育, 进而导致性早熟的发生。研究表明, 中华绒螯蟹的卵巢会进行二次发育(于智勇等, 2007; 李思发等, 2001)。本研究发现, 在盐度为 2 和 4 的水体中, 雌蟹交配后, 血淋巴中 E<sub>2</sub> 和睾酮含量有所增加, 原因可能是中华绒螯蟹在交配后卵巢进行二次发育所致, 这也与另一研究中得出在盐度为 2、4 的水体中, 雌蟹交配后的性腺成熟系数(GSI)有所升高的结果相一致(研究结果待发表); 本研究同时也发现, 当盐度为 6 时, 雌蟹产卵前后血淋巴中的睾酮含量均为最大值, 原因可能是当盐度为 6 时, 雌蟹的繁殖性能最低, 产卵量、生殖指数和生殖力均最小(研究结果待发表), 此时, 雌蟹体内仍保留大量营养, 可能正处于二次产卵前期。

虹鳟卵黄发生末期, E<sub>2</sub> 的含量达到最大值(Kraak *et al.*, 1984), 但卵母细胞最终成熟和排卵时 E<sub>2</sub> 浓度快速下降, 之后逐渐上升直至平稳, 原因是血淋巴中 E<sub>2</sub> 浓度降低, 导致芳香酶活力快速减弱和类固醇激素



对下丘脑和垂体的反馈抑制作用减弱,下丘脑快速促使垂体分泌大量 GTH (Fostier *et al*, 1978)。硬骨鱼类卵巢可合成睾酮,睾酮又在芳香酶的作用下转化为 E<sub>2</sub> (Zhao *et al*, 1985)。虹鳟在排卵前 30 d,血淋巴中 E<sub>2</sub> 含量下降,同时, GTH 升高, GTH 诱发卵巢产生了睾酮 (Scott *et al*, 1983),但此时芳香酶活力微弱,致使很大一部分睾酮未能继续转化成 E<sub>2</sub>,此时会形成排卵前一个短暂的峰值,这可能是为了调节 DHP 大量分泌的时间,这也是卵母细胞达到最终成熟和排卵不可或缺的一环 (赵维信, 1987)。与本研究结果不同的是除盐度为 18 外,其他盐度组雌蟹产卵后血淋巴中睾酮含量均呈上升趋势,原因可能是在中华绒螯蟹产卵阶段,睾酮含量对雌蟹与其他鱼类的作用机制存在差异。此外,赵维信 (1987) 发现,睾酮能加强 GTH 诱发 DHP 的合成;而 E<sub>2</sub> 抑制 GTH 诱发 DHP 的合成,且睾酮可转化为 E<sub>2</sub> (Zhao *et al*, 1985),表明这 2 种激素在一定时期呈负相关。在本研究中,雌蟹产卵后血淋巴中睾酮含量下降,而 E<sub>2</sub> 含量上升,这与上述结果基本一致。

赵维信 (1987) 研究表明,虹鳟中 E<sub>2</sub> 和睾酮主要作用仅是与机体卵黄发生有关,与卵母细胞成熟和排卵并无显著关系。本研究中, E<sub>2</sub> 和睾酮含量与盐度之间并无明显相关性,原因可能是这 2 种激素对亲蟹的影响主要集中在性腺发育阶段,在后续的交配产卵过程中发挥作用较小,这与已有相关研究结果基本一致。总之,目前,这 2 种激素对蟹类的生殖调控机制尚不清楚,还有待继续开展深入研究。

## 参 考 文 献

- AIDE K. A review of plasma hormone changes during ovulation in cyprinoid fishes. *Aquaculture*, 1988, 74: 11–20
- BERNDTSON A. In vitro ovulation, prostaglandin synthesis, and proteolysis in isolated ovarian components of yellow perch (*Perca flavescens*): Effects of 17 alpha, 20 beta-dihydroxy-4-pregnen-3-one and phorbol ester. *General and Comparative Endocrinology*, 1989, 75(3): 454–465
- BURNS B G, SANGALANG G B, FREEMAN H C, *et al*. Isolation and identification of testosterone from the serum and testes of the American Lobster (*Homarus americanus*). *General and Comparative Endocrinology*, 1984, 54: 429–432
- DU N S. Migration of *Eriocheir sinensis*. *Aquatic Science and Technology Information*, 2004, 31(2): 56–57 [堵南山. 中华绒螯蟹的洄游. *水产科技情报*, 2004, 31(2): 56–57]
- FOSTIER A, BERTON B. Binding of steroids by plasma of a teleost: the rainbow trout, *Salmo gairdnerii*. *Journal of Steroid Biochemistry*, 1975, 6(3/4): 345–351
- FOSTIER A, WEIL, C, TERQUI M, *et al*. Plasma estradiol-17β and gonadotropin during ovulation in rainbow trout (*Salmo gairdnerii*). *Annales Biologie Animale Biochimie Biophysique*. 1978, 18(4): 929–936
- GABRIELA T, MIREILLE C D, SILVIA C, *et al*. Effects of longterm exposure to different salinities on the location and activity of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in the gills of juvenile mitten crab *Eriocheir sinensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A, Molecular and Integrative Physiology*, 2007, 147(2): 460–465
- GOETZ F W. Hormonal control of oocyte final maturation and ovulation in fishes. *Fish Physiology Academic Press*, 1983, 9: 117–170
- IDLER D R, FAGERLUND U H M, RONALD A P. Isolation of pregn-4-ene-17α, 20β-diol-3-one from the plasma Pacific salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1960, 2(2): 133–137
- JALABERT B, BRETON B, BRZUSKA E, *et al*. A new tool for induced spawning: The use of 17α-hydroxy-20β-dihydroprogesterone to spawn carp at low temperature. *Aquaculture*, 1977, 10: 353–364
- JIANG R L, TAN Y J, WU J M, *et al*. Changes of hemolymph 20-hydroxyecdysone 17β-estradiol and testosterone levels in *Eriocheir sinensis*. *Journal of Fisheries of China*, 1992, 16(2): 101–104 [姜仁良, 谭玉钧, 吴嘉敏, 等. 中华绒螯蟹血淋巴中 20α-羟基蜕皮酮、17β-雌二醇和睾酮含量的变动. *水产学报*, 1992, 16(2): 101–104]
- KAGAWA H. In vitro estradiol-17β and testosterone production by ovarian follicles of the goldfish, *Carasius auratus*. *General and Comparative Endocrinology*, 1984, 54: 139–143
- KRAAK G V D, DYE H M, DONALDSON E M. Effects of LH-RH and des-Gly10 (D-Ala6) LH-RH-ethylamide on plasmas gonadotropin levels and oocyte maturation in adult female salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *General and Comparative Endocrinology*, 1984, 55: 36–45
- LI S F, WANG C H, ZHAO N G. Studies on gonad developmental rule of lake stocked mitten crab of Yangtze population. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2001, 25(4): 350–356 [李思发, 王成辉, 赵乃刚. 湖泊放养长江水系中华绒螯蟹的性成熟规律研究. *水生生物学报*, 2001, 25(4): 350–356]
- LIN H R. The secretion of gonadotropin and its regulatory mechanism. *Aquatic Life Collection*, 1982, 7(4): 551–562 [林浩然. 硬骨鱼类促性腺激素的分泌及其调节机制. *水生生物集刊*, 1982, 7(4): 551–562]
- LIN J. Content and changes of sex hormones in the gonad and serum of the artificially induced maturing *Anguilla marmorata* and *A. japonica*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2015 [林静. 人工催产花鳗鲡 (*Anguilla marmorata*) 卵巢发育过程中性类固醇激素含量影响. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2015]
- LIU L, GUO F, ZHANG J M, *et al*. Artificial induction of ovulation in Japanese eel *Anguilla japonica*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2005, 12(1): 49–54 [柳凌, 郭峰,

- 张洁明, 等. 日本鳗鲡排卵的人工诱导. 中国水产科学, 2005, 12(1): 49–54]
- LIU L, GUO F, ZHANG J M, *et al.* Artificial induction of ovulation in Japanese eel *Anguilla japonica*. Journal of Fishery Sciences of China, 2005, 12(1): 49–54 [柳凌, 郭峰, 张洁明, 等. 日本鳗鲡排卵的人工诱导. 中国水产科学, 2005, 12(1): 49–54]
- LUVIZOTTO-SANTOS R, LEE J T, PEREIRA-BRANCO Z P, *et al.* Lipids as energy source during salinity acclimation in the euryhaline crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea-grapsidae). Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology, 2003, 295A:200–205
- MEUNPOL O, DUANGJAI E, YOONPUN R, *et al.* Detection of prostaglandin E<sub>2</sub> in polychaete *Perinereis* sp. and its effect on *Penaeus monodon* oocyte development in vitro. Fisheries Science, 2010, 76(2): 281–286
- NAGARAJU G P C, REDDY P R, REDDY P S. Mandibular organ: It's relation to body weight, sex, molt and reproduction in the crab, *Ozotelphusa senex senex* Fabricius (1791). Aquaculture, 2004, 232: 603–612
- ONKEN H. Active NaCl absorption across split lamellae of posterior gills of Chinese crabs (*Eriocheir sinensis*) adapted to different salinities. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative, 1999, 123: 377–384
- OTSU T. Bihormonal control of sexual cycle in the freshwater crab *Potamon dehaani*. Embryologia, 1963, 8: 1–20
- PAN Y. Comparison of protein level in accessory gland and 17 estradiol and testosterone concentrations in hemolymph between normal and precocious male Chinese mitten handed crab *Eriocheir sinensis*. Chinese Journal of Fisheries, 2018, 31(3): 35–39 [潘颖. 正常和早熟雄性河蟹副性腺蛋白和血淋巴中 17 $\beta$ -雌二醇及睾酮浓度的比较. 水产学杂志, 2018, 31(3): 35–39]
- QU W L, PAN W Z, GUO J E, *et al.* Use 17 $\alpha$ -Hydroxyl-20 $\beta$  effect of dihydroxy progesterone on ovulation of loach under low temperature. Fisheries Science and Technology Information. 1986, 2(3): 6–8 [曲维良, 潘伟志, 郭继娥, 等. 用 17 $\alpha$ -羟基-20 $\beta$ -双羟基黄体酮促使泥鳅在低温下排卵效应的研究. 水产科技情报, 1986, 2(3): 6–8]
- REDDY P S, REDDY P R, NAGARAJU G P. The synthesis and effects of prostaglandins on the ovary of the crab *Ozotelphusa senex senex*. General and Comparative Endocrinology, 2004, 135(1): 35–41
- SCOTT A P, SUMPTER J P, HARDIMAN P A. Hormone changes during ovulation in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). General and Comparative Endocrinology, 1983, 49: 128–134
- WANG R F. Physical and behavioral response of *Eriocheir sinensis* broodstock, early developmental stages to salinity. Master's Thesis of East China Normal University, 2012 [王瑞芳. 长江中华绒螯蟹亲体和早期发育阶段对盐度的生理与行为响应. 华东师范大学硕士研究生学位论文, 2012]
- WANG W, WANG C H, MA X Z. Ecological breeding of crabs. Beijing: China Agricultural Press, 2013, 59–84 [王武, 王成辉, 马旭洲. 河蟹生态养殖. 北京: 中国农业出版社, 2013, 59–84]
- WEI W, WU J M, WEI H. Physiological mechanism of precociousness influenced by salinity in juvenile *Eriocheir sinensis*. Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(2): 275–280 [魏薇, 吴嘉敏, 魏华. 盐度对中华绒螯蟹性早熟生理机制的影响. 中国水产科学, 2007, 14(2): 275–280]
- WU S. Changes of fertilization rate, hatching rate and time after ovulation of Japanese eel induced by DHP. Fishery Modernization, 1997(5): 18–20 [吴善. 用 DHP 诱导日本鳗鲡排卵后受精率和孵化率与时间的变化. 渔业现代化, 1997(5): 18–20]
- XING J B, YOU J G, LI X, *et al.* Advances in prostaglandins in aquatic animals. Jiangxi Aquatic Science and Technology, 2019, 3(6): 46–43 [邢金宝, 由家国, 李旭, 等. 前列腺素在水产动物中的研究进展. 江西水产科技, 2019, 3(6): 46–49]
- YANO I, TSUKIMURA B, SWEENEY J N, *et al.* Induced ovarian maturation of *Penaeus vannamei* by implantation of lobster ganglion. Journal of the World Aquaculture Society, 1988, 19: 204–209
- YU Z Y, WU X G, CHANG G L, *et al.* Changes in major biochemical components in ovary and liver pancreas during the second ovarian development. Acta Hydrobiologica Sinica, 2007, 31(6): 799–806 [于智勇, 吴旭干, 常国亮, 等. 中华绒螯蟹第二次卵巢发育期间卵巢和肝胰腺中主要生化成分的变化. 水生生物学报, 2007, 31(6): 799–806]
- ZHAO W X, Wright R S. The course of steroid release by intact ovarian follicles of Atlantic salmon (*Salmo salar*) incubated *in vitro* with and without gonadotrophin. General and Comparative Endocrinology, 1985, 57: 274–280
- ZHAO W X. Changes of serum steroid levels during ovulation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Journal of Fisheries of China, 1987, 11(3): 205–214 [赵维信. 虹鳟排卵前后血清中性类固醇激素浓度变化的研究. 水产学报, 1987, 11(3): 205–214]
- ZHAO W X. Hormonal pheromones have sex with fish. Journal of Shanghai Fisheries University, 1986, 5(4): 10–12 [赵维信. 激素信息素与鱼类的性行为. 上海水产大学学报, 1986, 5(4): 10–12]
- ZHOU D G, WEN A X. The changes of levels of 6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  in serum during spawning induced with HCG in *Monopterus albus*. Acta Hydrobiologica Sinica, 2004, 28(5): 572–574 [周定刚, 温安祥. HCG 诱导排卵期间黄鳝血浆 6-酮-前列腺素 F1 $\alpha$  含量的变化. 水生生物学报, 2004, 28(5): 572–574]



## Effects of Salinity on Five Hormones in the Hemolymph of *Eriocheir sinensis* Before and After Mating and Spawning

HE Lulu<sup>1,2</sup>, GENG Zhi<sup>1,3</sup>, HUANG Xiaorong<sup>1,2,3</sup><sup>①</sup>, FENG Guangpeng<sup>1,2,3</sup>,  
ZHUANG Ping<sup>1,2,3</sup>, ZHAO Feng<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Tao<sup>1,2,3</sup>, YANG Gang<sup>1,3</sup>

(1. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of East China Sea and Oceanic Fishery Resources Exploitation and Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai 200090, China; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Shanghai Engineering Research Center of Fisheries Stock Enhancement and Habitat Restoration of the Yangtze Estuary, Shanghai 200090, China)

**Abstract** Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) belongs to Decapoda, Grapsidae and Eriocheir. It is also known as river crab and hairy crab and is widely distributed in the coastal waters of China and has important economic benefits. Salinity is the key environmental factor affecting the mating and spawning of *E. sinensis*. Presently, reports on the effects of salinity on crabs focus on osmotic pressure regulation, nutritional and energy metabolism, molting, and sexual precocity. However, the effects of salinity on the related hormones in the hemolymph before and after mating and spawning of *E. sinensis* have not been reported. Relevant steroid hormones include progesterone, 17 $\alpha$ -dihydroxyprogesterone, 20 $\beta$ -dihydroxyprogesterone, and 17 $\alpha$ -20 $\beta$ -dihydroxyprogesterone (DHP) and most effectively induce maturation of salmon and trout eggs, which has been confirmed in a variety of fish. Early studies have shown that the ovulation activity of fish is closely related to the level of gonadotropin (GTH) in the blood. The gonadotropin releasing hormone receptor (GnRHR) in *E. sinensis* indicate that the ovarian maturation and reproductive regulation in crustaceans are regulated by some gonadotropins, such as methylfarnesol and ecdysone. PGE, PGF, and prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) can promote ovulation in a variety of fish and crustaceans. Like vertebrates, steroids are important hormones that affect the ovarian development of shrimp and crab, such as estradiol (E<sub>2</sub>), testosterone (T), and progesterone. Steroids can impact gonadal development and play a very important role in ovarian development and vitellogenesis. However, these hormones are restricted by a variety of environmental factors, such as temperature, light, salinity, and so on. In order to investigate the effect of salinity on hemolymph related hormones during mating and spawning of *E. sinensis*, the spawning salinity was set at 0, 2, 4, 6 and mating salinity set at 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21. Five samples were collected from specimens in each salinity to analyze the contents of DHP, GTH, PG, E<sub>2</sub>, and testosterone in the hemolymph of female *E. sinensis* before and after mating and spawning under different mating and spawning salinities. The components were detected by ELISA at the wavelength of 450 nm using the kit double antibody sandwich method. Results revealed: (1) in fresh water, female crabs displayed no mating behavior. When the salinity was lower than 6, female crabs only mated without spawning. (2) There were no significant changes in PG, E<sub>2</sub>, or testosterone in the hemolymph of female crabs after mating in low salinity (2–6), and there was no significant difference between crabs at different salinities after mating ( $P>0.05$ ). (3) The contents of DHP, PG, E<sub>2</sub>, and testosterone in the hemolymph of female crabs initially decreased and then increased with salinity before spawning. After spawning, DHP, PG, and E<sub>2</sub> in hemolymph initially increased and then decreased with increased salinity. When the salinity was 18, DHP, PG, E<sub>2</sub>, and testosterone in the hemolymph of the female crab after spawning decreased to the lowest level, and there was a significant difference between the before and after spawning results ( $P<0.05$ ). (4) At 6

① Corresponding author: HUANG Xiaorong, E-mail: hxr828@126.com

salinity, the contents of DHP, PG, E<sub>2</sub>, and testosterone in the hemolymph of female crabs before spawning were the highest and the contents of DHP and PG decreased after spawning, while the contents of E<sub>2</sub> and testosterone increased. However, there was only significant variation in the DHP from before spawning to after spawning ( $P < 0.05$ ), and there was no significant difference in the other indexes ( $P > 0.05$ ). The content of testosterone in the hemolymph initially decreased and then increased before and after spawning. This comprehensive study showed that salinity effects the five hormones in the hemolymph of female *E. sinensis* during the reproductive and breeding stage. Among them, the five hormones do not change significantly during the mating process of *E. sinensis*. DHP, GTH, and PG are involved in the oviposition of *E. sinensis*. The analyses of the changes in the related hormones in the hemolymph of female *E. sinensis* before and after mating and spawning at different salinities have identified changes in the neutral hormones. These results provide details on the reproductive regulation mechanism of *E. sinensis* and provided basic reference data for researching the reproductive biology of *E. sinensis*.

**Key words** Salinity; *Eriocheir sinensis*; Mating; Spawning; Hormone