

DOI: 10.12264/JFSC2024-0041

温度对中国鲎幼体蜕壳及成活的影响

翁朝红^{1,2}, 陈瑞芳³, 谢仰杰^{1,2}, 陈志⁴, 钟赞民^{1,2}, 臧浩男^{1,2}, 吴思颖^{1,2}

1. 集美大学水产学院, 海水养殖生物育种全国重点实验室, 福建 厦门 361021;
2. 农业农村部东海海水健康养殖重点实验室, 福建 厦门 361021;
3. 广西科学院广西海洋生物种质资源利用技术创新中心, 广西 北海 536000;
4. 福建省淡水水产研究所, 福建 福州 350002

摘要: 为了评价温度对中国鲎(*Tachypleus tridentatus*)幼体培育效果的影响, 在实验室条件下利用自行设计的中国鲎幼体培育系统, 比较了仔鲎和稚鲎在 4 种水温(25、28、31 和 34 °C)条件下的蜕壳率、蜕壳时间和死亡率。结果表明, 经过 120 d 的培育, 仔稚鲎的总存活率在各温度组之间无显著差异($P>0.05$), 但较高培育温度能显著促进仔稚鲎蜕壳。实验结束时, 34 °C 组多数幼体为 4 龄稚鲎, 部分已进入 5 龄; 31 °C 组, 多数为 4 龄稚鲎; 28 °C 组, 多数为 3 龄稚鲎, 部分进入 4 龄; 25 °C 组, 多数为 2 龄稚鲎, 仅少数个体进入 3 龄。在实验期间内, 1 龄仔鲎的死亡率为 6.00%~19.33%, 其中 25 °C 温度组 1 龄仔鲎的死亡率显著高于 31 °C 和 34 °C 温度组($P<0.05$), 其余温度组之间无显著差异($P>0.05$); 2~4 龄稚鲎的死亡率在不同温度组之间无显著差异($P>0.05$)。1 龄仔鲎最早蜕壳时间在不同温度组之间差异显著($P<0.05$), 水温越高, 开始出现蜕壳的时间越早。根据各龄幼体蜕壳的加权平均时间和最早蜕壳时间推测, 在 25~34 °C 条件下, 2~4 龄幼体各龄期发育所需时间介于 27~43 d。1 龄期的发育时间受温度的影响显著大于 2 龄以上幼体。综合分析, 在适宜温度范围内, 水温升高能有效促进中国鲎仔鲎和稚鲎蜕壳, 31 °C 和 34 °C 均能获得很好的培育效果。结果提示, 在室内大规模培育大规格稚鲎是可行的, 鲎卵孵出 1 龄仔鲎后, 应及时采用较高温度进行培育, 使其能尽快发育蜕壳进入 2 龄, 避免低温导致仔鲎进入滞育状态。

关键词: 中国鲎; 仔鲎; 稚鲎; 温度; 培育

中图分类号: S968

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2024)06-0674-10

中国鲎(*Tachypleus tridentatus*)在我国曾经广泛分布于浙江、福建、台湾、广东、广西、海南等海域^[1-4]。中国鲎被称为活化石^[5], 具有很高的科研及经济价值。鲎的血液更是一种重要的医药资源, 鲎血细胞裂解制成的鲎试剂可用于检测细菌内毒素, 被广泛应用于医药、临床和食品等行业^[4,6]。由于其生境被破坏、资源被人类过度利用等原因, 中国鲎资源急剧减少, 上岸产卵的中国鲎几近绝迹, 潮间带正在成长的幼鲎也非常少见^[4-5]。中国鲎已成为濒危物种^[5,7-8], 2021 年被列为我国二级重点保护野生动物。

鲎与其他节肢动物类似, 通过蜕皮呈不连续生长。Kwan 等^[8]、Sekiguchi 等^[9]推测, 中国鲎需要约 10~15 年、蜕壳 16~18 次才能达到性成熟。因此, 中国鲎一旦种群遭到破坏, 仅依靠自然繁育, 资源很难恢复。通过人工育苗开展增殖放流是恢复鲎资源最有效、最迅速的方法^[10-11]。近 20 年来, 我国已开展多次中国鲎人工放流, 常见做法是在较深海域或码头将中国鲎成体或幼体投入海中, 而且幼体多为 1 龄仔鲎^[12]。因中国鲎幼体生活于潮间带, 幼体放流的地点大多不科学, 即使放流于适合的潮间带, 1 龄仔鲎在自然环境下

收稿日期: 2024-02-15; **修订日期:** 2024-04-04.

基金项目: 广西自然科学基金项目(2018GXNSFBA281071); 厦门市海洋与渔业研究所合作项目(S23013).

作者简介: 翁朝红(1971-), 女, 博士, 教授, 从事水生生物保护生物学研究. E-mail: wengzhaohong@jmu.edu.cn

通信作者: 谢仰杰, 博士, 教授, 从事海水养殖技术研究. E-mail: yjxie@jmu.edu.cn

的死亡率也很高^[13-14]。目前中国鲎的人工育苗技术还不够成熟,室内条件下幼体生长速度慢、成活率低、幼体饲养难度大、成本高^[11]。因此,研究环境因子对中国鲎幼体生长的影响,通过提高幼体培育技术进而人工繁育大规格幼体,并选择适宜的时间和海区进行人工放流,是保证增殖放流取得成效的关键。

水温是影响海洋动物分布和生长发育的主要环境因子之一。水温可通过影响甲壳类等的蜕壳进而影响其生长^[15]。已有一些学者对中国鲎胚胎发育和1龄仔鲎发育的最适温度进行了研究^[15-18]。Lee等^[19]探讨了中国鲎5~9龄幼体在18~22℃和28~32℃两个温度条件下的存活率和生长的差异,但迄今对于中国鲎稚鲎在不同温度条件下的生长发育情况仍知之甚少。Chen等^[20]在水温28~30℃条件下培育人工繁育的中国鲎幼体15.5月,幼体发育到9龄,获得1~9龄幼体发育所需时间,并推测中国鲎可在4年内发育到14龄和15龄;Tsuchiya^[21]报道了成功将中国鲎仔鲎培育至成熟成鲎,但缺乏各龄期发育时间的详细信息。前期工作发现,常温条件下幼体发育缓慢,提高培育温度能有效提高幼体的发育速度,促进幼体蜕壳,说明温度对中国鲎幼体的蜕壳影响非常显著。鉴于中国鲎人工放流对大规格鲎苗的迫切需求,中国鲎人工育苗技术亟待提高,而温度和底质又是中国鲎幼体发育的关键因素,亟待阐明不同温度对中国鲎幼体发育的影响。为此,本研究利用研制的幼体培育装置,比较几种温度条件下中国鲎幼体的蜕壳情况和成活率,并结合生产实际,初步探讨底沙对1龄仔鲎蜕壳的影响。在此基础上,进一步探讨中国鲎幼体培育技术,以期提高中国鲎幼体培育效果,为大规格幼鲎的人工放流提供技术条件,同时丰富鲎生理生态学理论知识。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用1龄仔鲎由广西海洋研究所有限责任公司提供[繁育证编号:(桂)水野繁育字(2023)0503007号],为孵出35d的1龄仔鲎,前体

部宽(5.92±0.46) mm,体重(0.0284±0.0032) g。仔鲎运至实验室后暂养于23℃海水中。实验使用的水为砂滤自然海水,盐度为26。在实验期间,通过补充淡水维持盐度的稳定。

实验所用饵料为卤虫(*artemia*)无节幼体,于实验室内孵化卤虫休眠卵所得,孵化用水盐度30,孵化温度(28±1)℃,孵化密度1 g/L,孵出后24 h内分离除去卵壳后调整到2000只/mL的密度,用于投喂。

1.2 实验方法

实验共设4个温度组(25、28、31、34℃),每组各设3个平行组。

实验采用12个长44 cm、宽30 cm、高30 cm的相同规格玻璃缸,各加入新鲜砂滤海水25 L,水深19 cm,并放入气石增氧。每个缸中放入底部铺设2 cm厚细沙(粒径0.3~0.5 mm)、底部可透水的塑料盒(长23 cm、宽16 cm、高8.5 cm),利用气提泵将水从玻璃缸泵入塑料盒中,水透过底沙从塑料盒底部渗出流回玻璃缸中,实现塑料盒内外的水循环。每个塑料盒各放入1龄仔鲎50只。玻璃缸中放置电热棒,利用控温仪控制水温(图1)。实验开始后,各组从23℃开始,以每8 h增加1℃的速度,将水温分别升至设定的实验温度,此后使水温保持在设定温度±1℃范围内(以塑料盒内的水温为准)。室温过高时,开启室内空调,保持室温26℃,能确保最低温度组(25℃)的温度稳定。实验期间,当水分蒸发、水位降低时及时补充淡水(经曝气除氯的自来水)以保持玻璃缸中的水位,防止因为水分蒸发而造成水体盐度升高。定期使用水质测定仪测量水体盐度、氨氮,若水质指标发生变化,及时换水以调控水质。每30 d清洗底沙并换水1次。

每天观察各组仔鲎、稚鲎生长发育情况。当发现有透明或淡黄色鲎壳时,表明有仔鲎或稚鲎蜕壳,及时取出鲎壳并记录蜕壳数。发现死亡的仔鲎或稚鲎时取出死鲎并记录。仔鲎开始蜕壳的温度组,每天早晚各投喂一次人工孵化的卤虫无节幼体,通过观察摄食情况决定投饵量,一般以第2次投饵时几乎无残饵为宜。如果残饵少于1只/mL,在上次投饵量的基础上增加10%;如果

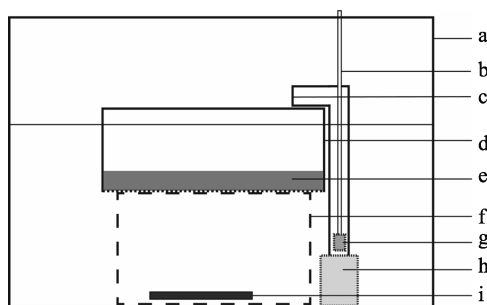


图 1 实验装置示意图

a. 玻璃缸; b. 气管; c. 气提泵出水口; d. 塑料盒; e. 底沙;
f. 支架; g. 散气石; h. 过滤海绵; i. 温控电热棒。

Fig. 1 Schematic diagram of device for experiment

a. Glass tank; b. Air pipe; c. Air lift pump outlet; d. Plastic box;
e. Bottom sand; f. Support; g. Air stone; h. Filter sponge;
i. Temperature controlled electric heating rod.

残饵为 1~5 只/mL, 按上次的投饵量进行投饵; 如果残饵超过 5 只/mL, 暂停投饵。投饵前先将卤虫无节幼体调整到 2000 只/mL 的密度, 再根据体积取所需的量进行投喂。实验共进行 120 d。每隔 30 d 统计各温度组各龄幼体的累计蜕壳率和累计死亡率, 实验结束后统计各组各龄幼体的最早蜕壳时间、最后蜕壳时间和平均蜕壳时间(从实验开始至蜕壳所经历的天数)。

死亡率、蜕壳率按不同壳龄分别计算, 计算公式如下:

$$\text{死亡率} = N_t / N_0 \times 100\%$$

$$\text{蜕壳率} = T / N_0 \times 100\%$$

式中, N_t 为实验期间记录的总的死亡个体数; N_0 为各龄幼体的初始数量(1 龄仔蟹的初始数量为 50, 2 龄稚蟹的初始数量按 1 龄仔蟹的蜕壳数量计算, 依此类推); T 为蜕壳数量(以蟹壳数量计)。

蜕壳时间均是从实验开始所经历的时间。各龄期发育时间是从上一龄蜕壳开始至再次蜕壳所需时间。

平均蜕壳时间为加权平均时间, 按下式计算:

$$\text{平均蜕壳时间} / d = \Sigma(i \times N_i) / \Sigma(N_i)$$

式中, i 为实验开始后的天数; N_i 为第 i 天的蜕壳数。如果实验结束时尚有同龄个体未蜕壳, 则在计算所得的平均蜕壳时间前加“>”号表示。

1.3 数据处理

应用 SPSS 25.0 软件对所得结果进行单因素方差分析, 确定蜕壳率、死亡率、最早蜕壳时间、

平均蜕壳时间在不同温度组之间的差异显著性水平。各组数据用 Shapiro-Wilk 检验正态性, 再用 Levene 检验方差齐性。当满足方差齐性时, 利用 Duncan 法检验组间平均值的差异显著性; 当未满足方差齐性时, 使用 Dunnett's T3 检验组间平均值的差异显著性。 $P \leq 0.05$ 表示差异显著, $P > 0.05$ 表示差异不显著。数据以“平均值±标准差”表示。

2 结果与分析

2.1 各温度组仔蟹和稚蟹的存活率及龄期组成

在不同温度条件下培育仔、稚蟹 30、60、90 和 120 d, 总存活率分别为 95.33%~100%、74.00%~90.00%、54.00%~72.00% 和 49.33%~58.67%, 在相同时间, 总存活率在各温度组之间无显著差异 ($P > 0.05$), 但龄期组成有明显差异(图 2)。实验第 30 天, 31 °C 和 34 °C 温度组中超过 50% 的 1 龄仔蟹蜕壳进入 2 龄; 28 °C 组仅 8.67% 进入 2 龄; 25 °C 组尚无 2 龄稚蟹。实验第 60 天, 28、31 和 34 °C 组多数幼体为 2 龄, 部分进入 3 龄; 25 °C 组仅 20% 进入 2 龄。实验第 90 天, 34、31 和 28 °C 组多数幼体为 3 龄, 部分进入 4 龄; 25 °C 组仍有 23.33% 的 1 龄仔蟹未蜕壳。实验第 120 天, 34 °C

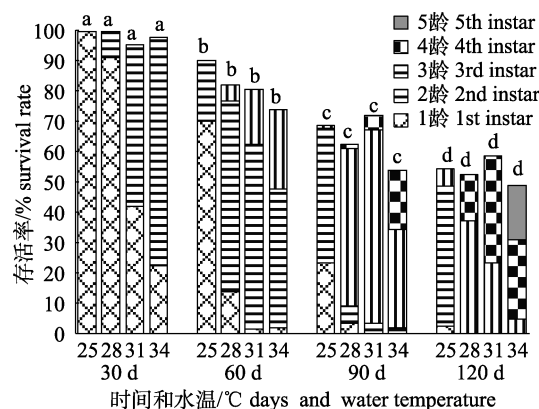


图 2 实验开始后第 30、60、90 和 120 天各温度组仔蟹和稚蟹的存活率及龄期组成
相同时间内, 有相同上标字母的温度组之间
总存活率无显著差异 ($P > 0.05$).

Fig. 2 Survival rate and instar composition of larval and juvenile horseshoe crabs under different temperatures at 30, 60, 90 and 120 days
The total survival rates have no significant difference between temperature groups with the same superscript letter in the same day ($P > 0.05$).

组多数幼体为 4 龄, 部分已进入 5 龄; 31 ℃组, 多数为 4 龄稚鲎; 28 ℃组, 多数为 3 龄稚鲎, 部分进入 4 龄; 25 ℃组, 多数为 2 龄稚鲎, 仅少数个体进入 3 龄。结果表明, 在实验温度范围内, 提高温度能显著促进仔、稚鲎的发育。

2.2 各温度组幼体的蜕壳率和死亡率

实验开始后 30 d, 34 ℃温度组的 1 龄仔鲎的蜕壳率最高, 达(76.67±4.16)%; 其次是 31 ℃温度组; 再次是 28 ℃温度组; 25 ℃温度组未见有仔鲎蜕壳(表 1)。

表 1 各温度条件下中国鲎仔、稚鲎蜕壳率
Tab. 1 Molting rates of the larvae and juvenile of *Tachypleus tridentatus* at different temperatures

龄期 stage	时间/d day	温度/℃ temperature			
		25	28	31	34
1	30	0 ^a	8.67±3.06 ^a	56.67±16.65 ^b	76.67±4.16 ^c
1	60	20.00±12.17 ^a	76.00±2.00 ^b	93.33±4.62 ^c	90.67±2.31 ^c
1	90	60.67±4.16 ^a	84.67±5.03 ^b	94.00±5.29 ^c	92.00±2.00 ^{bc}
1	120	78.00±6.93 ^a	86.67±4.16 ^{ab}	94.00±5.29 ^b	92.00±2.00 ^b
2	120	9.41±1.35 ^a	75.39±0.34 ^c	78.15±4.27 ^c	67.35±4.80 ^b
3	120	0	23.80±17.94 ^a	51.75±4.12 ^b	74.75±19.39 ^b
4	120	/	/	/	40.08±11.29

注: 同一行中, 无相同上标字母的两个温度组之间差异显著 ($P<0.05$).
Note: There is significant difference between two temperature groups without same superscript letter in the same row ($P<0.05$).

实验开始后 60 d, 31 ℃和 34 ℃温度组的 1 龄仔鲎的蜕壳率均分别达(93.33±4.62)%和(90.67±2.31)%, 二者之间无显著差异($P>0.05$), 且均显著高于其他 2 个温度组($P<0.05$); 28 ℃温度组的 1 龄仔鲎的蜕壳率已达(76.00±2.00)%; 25 ℃温度组的 1 龄仔鲎的蜕壳率最低, 仅为(20.0±12.17)% (表 1)。

在实验开始后 120 d, 1 龄仔鲎在 25、28、31 和 34 ℃这 4 个温度组的蜕壳率分别达(78.00±6.93)%、(86.67±4.16)%、(94.00±5.29)%和(92.00±2.00)%; 在 31 ℃和 34 ℃温度组的仔鲎的蜕壳率比在 25 ℃温度组的显著高($P<0.05$), 但 28 ℃的与其他 3 组无显著差异($P>0.05$) (表 1)。

在实验开始后 120 d, 2~4 龄稚鲎在不同温度组的蜕壳率见表 1。2 龄稚鲎蜕壳率在 28 ℃温度

组与 31 ℃温度组之间无显著差异($P>0.05$), 均高于 34 ℃温度组($P<0.05$), 25 ℃温度组最低。3 龄稚鲎蜕壳率在 31 ℃温度组和 34 ℃温度组之间无显著差异($P>0.05$), 均高于 28 ℃温度组($P<0.05$); 4 龄稚鲎仅 34 ℃温度组有部分蜕壳, 蜕壳率为(40.08±11.29)%。

在实验期内, 1 龄仔鲎的死亡率为 6.00%~19.33%, 其中 25 ℃温度组 1 龄仔鲎的死亡率(19.33±6.43)%显著高于 31 ℃温度组[(6.00±5.29)%]和 34 ℃温度组[(8.00±2.00)%]($P<0.05$)。2 龄稚鲎的死亡率为 21.85%~32.08%, 各温度组之间无显著差异($P>0.05$)。3 龄稚鲎的死亡率为 16.47%~22.22%, 各温度组之间无显著差异($P>0.05$)。31 ℃和 34 ℃温度组的 4 龄稚鲎的死亡率分别为(7.84±13.58)%和(5.00±6.08)%, 2 组之间无显著差异($P>0.05$)(表 2)。

表 2 实验期内(120 d)各温度条件下中国
鲎仔鲎和稚鲎的死亡率
Tab. 2 Mortality rates of the larvae and juveniles of *Tachypleus tridentatus* under different temperatures during experiment (120 d)

幼体龄期 instar stage	温度/℃ temperature			
	25	28	31	34
1	19.33±6.43 ^a	12.67±5.03 ^{ab}	6.00±5.29 ^b	8.00±2.00 ^b
2	32.08±19.16 ^a	24.61±0.34 ^a	21.85±4.27 ^a	31.94±5.11 ^a
3	22.22±38.49 ^a	20.38±8.62 ^a	16.47±12.25 ^a	19.19±18.42 ^a
4	—	—	7.84±13.58 ^a	5.00±6.08 ^a

注: 同一行中, 无相同上标字母的两个温度组之间差异显著 ($P<0.05$).
Note: There is significant difference between two temperature groups without same superscript letter in the same row ($P<0.05$).

2.3 各温度组各龄幼体的蜕壳时间

各温度组各龄幼体的蜕壳时间见表 3~表 6。水温越高, 1 龄仔鲎开始出现蜕壳的时间越早。实验开始后第 13 天, 34 ℃温度组开始有 1 龄仔鲎蜕壳进入 2 龄; 31 ℃和 28 ℃温度组分别在第 16 天和第 20 天出现 1 龄仔鲎蜕壳; 25 ℃温度组于第 39 天才开始出现蜕壳(表 3), 最早蜕壳时间在各温度组之间差异显著($P<0.05$)。至实验结束时, 25 ℃和 28 ℃温度组仍有若干 1 龄仔鲎未蜕壳。不考虑未蜕壳个体, 25、28、31、34 ℃温度组 1 龄

仔鲎从实验开始至蜕壳的平均时间分别为(74.10±0.94) d, 31 ℃和 34 ℃温度组之间无显著差异(7.54) d、(42.58±2.83) d、(28.53±2.93) d 和(24.86±(P>0.05), 其余各组之间差异显著(P<0.05)(表 3)。

表 3 各温度条件下 1 龄仔鲎的蜕壳时间
Tab. 3 Molting days of the first instar larvae of *Tachypleus tridentatus* at different temperatures

n=3; $\bar{x}\pm$ SD; d

项目 item	温度/℃ temperature			
	25	28	31	34
最早蜕壳时间 the earliest molting days	41.00±2.00 ^d (39-43)	21.33±2.31 ^c (20-24)	16.33±0.58 ^b (16-17)	13.33±0.58 ^a (13-14)
最后蜕壳时间 the latest molting days	>120 ^a	>103.5±4.95 ^b	54.67±11.02 ^c	65.00±10.54 ^c
平均蜕壳时间 average molting days	>74.10±7.54 ^c	>42.58±2.83 ^b	28.53±2.93 ^a	24.86±0.94 ^a

注: 括号内的数字为范围(最小值~最大值). 实验结束时如未全部蜕壳, 加“>”表示. 同一行无相同上标字母的两温度组之间差异显著(P<0.05).
Note: The numbers in brackets are ranges (minimum-maximum). If there were any individuals who have not yet molted at the end of the experiment, add ">" to indicate. There is significant difference between two temperature groups without same letter in the same row (P<0.05).

25、28、31 和 34 ℃各温度组最早出现 2 龄稚鲎蜕壳的时间分别为实验开始后第 74、49、42 和 41 天。2 龄稚鲎最早蜕壳时间平均值在 28、31 和 34 ℃这 3 组之间无显著差异(P>0.05), 但均显著早于 25 ℃温度组(P<0.05)。不考虑未蜕壳个体, 25、28、31 和 34 ℃温度组的 2 龄稚鲎的平均蜕壳时间分别为(97.78±14.46) d、(76.47±2.24) d、(66.85±3.53) d 和(59.43±3.59) d (表 4)。

表 4 各温度条件下 2 龄稚鲎的蜕壳时间
Tab. 4 Molting days of the second instar juvenile of *Tachypleus tridentatus* under different temperatures

n=3; $\bar{x}\pm$ SD; d

项目 item	温度/℃ temperature			
	25	28	31	34
最早蜕壳时间 the earliest molting days	84.00±9.54 ^a (74-93)	50.33±1.53 ^b (49-52)	46.33±5.13 ^b (42-52)	41.67±0.58 ^b (41-42)
最后蜕壳时间 the latest molting days	>120	110.00±7.94	92.67±7.57	>87.50±17.68
平均蜕壳时间 average molting days	>97.78±14.46 ^c	76.47±2.24 ^b	66.85±3.53 ^{ab}	>59.43±3.59 ^a

注: 括号内的数字为范围(最小值~最大值). 实验结束时如未全部蜕壳, 加“>”表示. 同一行无相同上标字母的两温度组之间差异显著(P<0.05).
Note: The numbers in brackets are ranges (minimum-maximum). If there were any individuals who have not yet molted at the end of the experiment, add ">" to indicate. There is significant difference between two temperature groups without same letter in the same row (P<0.05).

在实验期内, 25 ℃温度组无 3 龄稚鲎蜕壳; 但均显著高于 28 ℃温度组(P<0.05)(表 5)。实验结束时, 各组均有尚未蜕壳的 3 龄稚鲎。3 龄稚鲎全部蜕壳的 34 ℃的 2 个平行组的 3 龄稚鲎的平均蜕壳时间分别为第 82 天和第 93 天。

表 5 各温度条件下 3 龄稚鲎的蜕壳时间
Tab. 5 Molting days of the third instar juvenile of *Tachypleus tridentatus* under different temperatures

n=3; $\bar{x}\pm$ SD; d

项目 item	温度/℃ temperature			
	25	28	31	34
最早蜕壳时间 the earliest molting days	—	92.67±8.96 ^a (87~103)	77.67±5.51 ^b (74~84)	72.67±8.08 ^b (68~82)
最后蜕壳时间 the latest molting days	—	>120	>120	>115.5±4.95
平均蜕壳时间 average molting days	—	>105.22±2.57	>99.95±3.42	>91.85±9.45

注: 括号内的数字为范围(最小值~最大值). 实验结束时如未全部蜕壳, 加“>”表示. 同一行无相同上标字母的两温度组之间差异显著(P<0.05).
Note: The numbers in brackets are ranges (minimum-maximum). If there were any individuals who have not yet molted at the end of the experiment, add ">" to indicate. There is significant difference between two temperature groups without same letter in the same row (P<0.05).

在实验期内, 仅 34 ℃ 温度组有 4 龄稚鲎蜕壳, 最早蜕壳时间出现在第 97 天(表 6)。

表 6 各温度条件下 4 龄稚鲎的蜕壳时间
Tab. 6 Molting days of the fourth instar juvenile of *Tachypleus tridentatus* under different temperatures

项目 item	温度/℃ temperature			
	25	28	31	34
最早蜕壳时间 the earliest molting days	—	—	—	99.67±2.52 (97-102)
最后蜕壳时间 the latest molting days	—	—	—	>120
平均蜕壳时间 average molting days	—	—	—	>109.45±3.09

注: 括号内的数字为范围(最小值~最大值)。实验结束时如未全部蜕壳, 加“>”表示。同一行无相同上标字母的两温度组之间差异显著($P<0.05$)。
Note: The numbers in brackets are ranges (minimum-maximum). If there were any individuals who have not yet molted at the end of the experiment, add ">" to indicate. There is significant difference between two temperature groups without same letter in the same row ($P<0.05$).

2.4 中国鲎各龄幼体在实验温度条件下发育所需时间

观察发现, 中国鲎幼体发育的同步性较低, 通过单一个体实验来获得各龄期发育所需时间具有一定的难度和局限性。利用前述研究结果, 根据各温度组各龄幼体的蜕壳情况, 可推测得出各龄期幼体在不同温度条件下发育所需时间。

因受到条件限制, 本实验不是从 1 龄仔鲎孵出时开始, 因此无法得出 1 龄仔鲎在不同温度下

从孵出到蜕壳所需时间。根据本实验 1 龄仔鲎蜕壳的加权平均时间, 可知在不同温度条件下, 中国鲎从实验开始到 1 龄仔鲎蜕壳所需平均时间分别为 $>(74.10\pm7.54)$ d (25 ℃)、 $>(42.58\pm2.83)$ d (28 ℃)、 (28.53 ± 2.93) d (31 ℃)和 (24.86 ± 0.94) d (34 ℃)(表 3)。

假设实验中中国鲎同龄期幼体在相同温度下发育时间一致, 在各平行组中最早蜕壳的仔鲎在下一阶段也最早蜕壳, 则根据不同龄期最早蜕壳时间, 可获得 25~34 ℃ 条件下 2 龄稚鲎发育所需时间分别为 43.00 d (25 ℃)、29.00 d (28 ℃)、30.00 d (31 ℃)和 28.33 d (34 ℃); 28~34 ℃ 条件下 3 龄稚鲎发育所需时间分别为 42.33 d (28 ℃)、31.33 d (31 ℃)和 31.00 d (34 ℃); 34 ℃ 条件下 4 龄稚鲎发育所需时间为 27 d(表 7)。

根据各龄幼体蜕壳的加权平均时间, 推断获得不同温度条件下中国鲎各龄期发育所需时间: 28~34 ℃ 条件下 2 龄稚鲎发育所需时间分别为 >23.83 d (25 ℃)、 >33.89 d (28 ℃)、 38.32 d (31 ℃)和 >34.57 d (34 ℃); 3 龄稚鲎发育所需时间分别为 >28.75 d (28 ℃)、 >33.10 d (31 ℃)和 30.50 d (34 ℃); 34 ℃ 条件下 4 龄稚鲎发育所需时间 >17.60 d (表 7)。

总体上, 在 25~34 ℃ 条件下, 2~4 龄幼体各龄期发育所需时间介于 27~43 d, 而 1 龄期仔鲎发育所需时间介于 24.86~74.10 d(从实验开始计算), 说明 1 龄期的发育时间受温度的影响更大。

表 7 不同温度条件下中国鲎各龄期发育所需时间
Tab. 7 The development time of each instar stage under different temperature conditions

项目 item	温度/℃ temperature			
	25	28	31	34
2 龄期发育所需时间(根据最早蜕壳时间计算) development time of the 2nd instar (based on earliest molting time)	43.00	29.00	30.00	28.33
2 龄期发育所需时间(根据平均蜕壳时间计算) development time of the 2nd instar (based on average molting time)	>23.83	>33.89	38.32	>34.57
3 龄期发育所需时间(根据最早蜕壳时间计算) development time of the 3rd instar (based on earliest molting time)	—	42.33	31.33	31.00
3 龄期发育所需时间(根据平均蜕壳时间计算) development time of the 3rd instar (based on average molting time)	—	>28.75	>33.10	30.50
4 龄期发育所需时间(根据最早蜕壳时间计算) development time of the 4th instar (based on earliest molting time)	—	—	—	27.00
4 龄期发育所需时间(根据平均蜕壳时间计算) development time of the 4th instar (based on average molting time)	—	—	—	>17.60

注: 实验结束时如未全部蜕壳, 加“>”表示。
Note: If there were any individuals who have not yet molted at the end of the experiment, add ">" to indicate.

3 讨论

3.1 温度对中国鲎仔鲎和稚鲎蜕壳和存活的影响

现有文献对中国鲎蜕壳情况的报道差异甚大,1龄仔鲎发育至蜕壳的时间从53.2 d至几个月不等,1年的蜕壳次数1~7次不等^[9,16-17,20],且有文献提到1龄仔鲎当年不蜕壳^[9]。已有学者对1龄仔鲎的培育结果表明,在25~33℃的温度范围内,随着温度升高,仔鲎开始蜕壳的时间提早,28~33℃均可获得较好的培育效果^[15-17]。

本研究观察了4种温度条件下中国鲎幼体的生长和存活情况,其中31℃和34℃均获得很好的培育效果,结果与董兰芳等^[15]的研究结果一致。据作者另外的观察,暂养于23℃海水中的同批1龄仔鲎,直至实验结束,也未发现蜕壳;此外,长时间(如过冬到次年)处于滞育状态的仔鲎,水温升高后,蜕壳率也很低,可能是营养消耗过度所致。结果提示,在进行中国鲎幼体培育时,鲎卵孵出1龄仔鲎后,应及时采用较高的温度进行培育,使其能尽快生长发育蜕壳进入2龄,避免低温使仔鲎进入滞育状态。本研究未开展超过34℃的培育试验,但就1龄仔鲎而言,根据董兰芳等^[15]的研究,35℃和37℃的培育效果不如33℃。同时,考虑加温成本,在生产上采用超过34℃的水温进行仔鲎培育并不可取。因此,根据本研究结果,在28~34℃条件下培育仔鲎和稚鲎较为合适。该结果对于鲎的人工繁育具有指导意义。在以前的研究和生产中,由于未意识到中国鲎仔鲎发育对高水温的要求,大量1龄仔鲎因水温偏低,未能蜕壳进入2龄,一旦过冬,便大量死亡。

Ehlinger等^[18]的研究表明,35℃以上美洲鲎鲎卵不能孵出仔鲎;25℃的胚胎发育时间明显长于33℃和33℃,适宜的孵化温度是30~33℃。由此可见,美洲鲎与中国鲎在早期发育阶段对温度的适应性相似。与多数甲壳类相比,鲎幼体更适应于高温,耐高温能力更强,这与其生活习性相符。

本研究通过观察底沙表面的鲎壳来判断仔鲎和稚鲎蜕壳情况。观察结果表明,中国鲎仔鲎和稚鲎平时多潜入沙中,蜕壳时爬出沙子,蜕出的

壳沉于底沙表面,容易发现。本研究采用计算空壳的方法判断蜕壳情况。统计结果表明,空壳数与仔鲎、稚鲎数量吻合,说明该方法可行,结果可靠。

3.2 室内大规模培育大规格稚鲎的可行性

中国鲎资源濒临灭绝,增殖放流已成为资源恢复的重要措施。近年已有不少政府或民间组织的放流行为^[1]。但这些放流行为大多放流1龄仔鲎或2龄稚鲎,预期存活率很低。Botton等^[14]推测,美洲鲎三叶虫期幼体从浮游习性转变为底栖习性阶段的存活率只有2.5%左右。因此,要提高放流后的成活率,放流大规格中国鲎显得尤为重要。Chen等^[20]在水温28~30℃条件下培育人工繁育的中国鲎幼体,幼体孵出后1年内可发育到7龄,在15.5月内可发育到9龄,证明了人工培育大规格稚鲎用于放流和养殖的可行性。本研究从1龄仔鲎开始培育,在120 d内,部分个体已发育至5龄(34℃温度组),28、31和34℃这3个温度组发育进入3龄的个体数占实验初始1龄仔鲎总数的60%以上,其中31℃温度组达到72%以上,进一步证明了人工培育大规格稚鲎的可行性。本研究由于条件限制,只用卤虫无节幼体作饵料。另有实验表明,投喂桡足类可以取得更好的培育效果。本研究结果进一步证明了在室内大规模培育大规格稚鲎的可行性。推测如果条件适合,1龄仔鲎经过1年培育可以发育到8龄以上。这对于中国鲎的放流增殖具有重要的指导作用。

3.3 中国鲎各龄期的发育时间

Mishra^[22]在实验室条件下观察了巨鲎从孵化开始至孵化后180 d稚鲎的生长和蜕壳行为,1龄仔鲎经过180 d培育可以蜕壳4次至5龄幼体,1~4龄发育时间分别为30 d、15 d、45 d、90 d。根据Kwan等^[8]的研究,在30~35℃条件下,美洲鲎大多数仔鲎在孵出9~15 d后蜕壳成为2龄,平均11.2~12.8 d。Schreibman等^[23]在20~25℃条件下培育美洲鲎稚鲎,在最初的18个月内每半年蜕壳2或3次。Jegla等^[24]在不同温度和盐度条件下培育美洲鲎,前3次蜕壳期间平均为12.5~13 d,发育速度明显快于Schreibman等^[23]的研究结果。

本研究未能获得1龄仔鲎从孵化出膜开始发

育至蜕壳所需时间,但从实验开始到 1 龄仔鲎蜕壳所需平均时间分别为 $>(74.10\pm 7.54)$ d (25°C)、 $>(42.58\pm 2.83)$ d (28°C)、 (28.53 ± 2.93) d (31°C)和 (24.86 ± 0.94) d (34°C)。根据各龄幼体蜕壳的加权平均时间和最早蜕壳时间推测,在 $25\sim 34^{\circ}\text{C}$ 条件下,2~4 龄幼体各龄期发育所需时间介于 27~43 d,显著长于美洲鲎,与巨鲎相近。其中,中国鲎 1 龄期的发育时间受温度的影响大于 2 龄以上幼体。Chen 等^[20]的研究结果表明,在水温 $28\sim 30^{\circ}\text{C}$ 条件下,人工繁育的中国鲎幼体 1~4 龄发育时间分别为 53.2 d、80.7 d、20.7 d 和 44.1 d,其中 2 龄稚鲎的发育时间明显长于本研究所得结果。推测可能与饵料密度有关,2 龄期稚鲎摄食能力有限,本研究所用培育装置可以为稚鲎提供足够的饵料密度,促进稚鲎摄食,缩短发育时间。

3.4 中国鲎幼体培育装置的培育效果

利用本团队研制的幼体培育装置培育中国鲎幼体,根据鲎幼体潮间带生境特点,铺设底沙,且利用气提泵抽水作用,实现鲎养殖系统内外水循环,获得良好培育效果。一方面,底沙能为仔鲎和稚鲎提供良好的埋栖环境;另一方面,循环流水保证了底沙良好的水质环境,也能起一定的过滤作用,防止水体浑浊而影响仔鲎和稚鲎的呼吸和摄食,保障仔鲎和稚鲎良好的生长发育环境;此外,由于底沙的存在,可以保证饵料集中在小水体中,能提供较高的饵料密度便于稚鲎摄食。同时,加热棒与仔稚鲎隔离,可避免仔稚鲎被高温烫伤。

生产上,通常将 1 龄仔鲎放在网框中漂浮于水面,网框内不加沙也不投饵,便于观察和管理。作者另有实验表明,采用本研究的实验装置培育 1 龄仔鲎,能促进仔鲎蜕壳,显著提早蜕壳时间。实验期间未观察到 1 龄仔鲎摄食,由此推测,促进仔鲎蜕壳的主要因素是底沙。梁广耀^[16]、程鹏等^[25]的研究结果也证明中国鲎仔鲎在含沙或泥的海水中比在普通海水中生长发育得更好,发育为 2 龄所需时间更短。底沙的存在,一方面符合仔稚鲎的生态习性;另一方面,仔稚鲎潜入底沙后,活动量下降,可以减少在水中不停游动的体力消耗,有助于发育和蜕壳。

4 结论及展望

本研究利用自行设计的中国鲎幼体培育装置培育中国鲎仔稚鲎 120 d,获得了仔稚鲎在 4 种水温条件下的蜕壳率、蜕壳时间、死亡率和 2~4 龄期的发育时间。结果表明,在适宜温度范围内,水温升高能有效促进中国鲎仔鲎和稚鲎蜕壳, 31°C 和 34°C 均能获得很好的培育效果。根据本研究结果,在室内大规模培育大规格稚鲎是可行的。如果饵料充足、条件适合,1 龄仔鲎经过 1 年培育可以发育到 8 龄以上。研究结果可为大规模人工培育大规格中国鲎幼体提供参考,对于中国鲎的放流增殖具有指导作用。

后续研究的重点,一是进一步研究温度对 4 龄以上稚鲎生长发育的影响;二是将研究结果应用于生产,将规模化生产大规格中国鲎用于养殖和增殖放流。

参考文献:

- [1] Hong S G. Biology of horseshoe crab, *Tachypleus tridentatus*[M]. Xiamen: Xiamen University Press, 2011: 58-230. [洪水根. 中国鲎生物学研究[M]. 厦门: 厦门大学出版社, 2011: 58-230.]
- [2] Liao Y Y, Liu J X. Species and distribution of horseshoe crab in Asia Sea area[J]. Journal of Tropical Oceanography, 2006, 25(6): 85-90. [廖永岩, 刘金霞. 亚洲海域鲎的种类和分布[J]. 热带海洋学报, 2006, 25(6): 85-90.]
- [3] Hsieh H L, Chen C P. Current status of *Tachypleus tridentatus* in Taiwan for red list assessment[M]// Carmichael R H, Botton M L, Shin P K S, et al. Changing Global Perspectives on Horseshoe Crab Biology, Conservation and Management. Cham: Springer, 2015: 383-396.
- [4] Weng Z H, Xie Y J, Xiao Z Q, et al. Distribution and resource of Chinese horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*) in Fujian and other coast water of China[J]. Chinese Journal of Zoology, 2012, 47(3): 40-48. [翁朝红, 谢仰杰, 肖志群, 等. 福建及中国其他沿岸海域中国鲎资源分布现状调查[J]. 动物学杂志, 2012, 47(3): 40-48.]
- [5] Kwan B K Y, Hsieh H L, Cheung S G, et al. Present population and habitat status of potentially threatened Asian horseshoe crabs *Tachypleus tridentatus* and *Carcinoscorpius rotundicauda* in Hong Kong: A proposal for marine protected areas[J]. Biodiversity and Conservation, 2016, 25(4): 673-692.
- [6] Yan M Y, Wang Y, Gu H X, et al. Current situation of *tachypleus* amebocyte lysate industry in China and relevant

- suggestions[J]. Journal of Biology, 2018, 35(2): 88-91. [颜明艳, 王月, 顾华鑫, 等. 鲨试剂产业在中国的发展现状及相关建议[J]. 生物学杂志, 2018, 35(2): 88-91.]
- [7] Kwan K Y, Fu Y J, Zhong M F, et al. Spatiotemporal distribution of Asian horseshoe crab eggs are highly intermingled with anthropogenic structures in Northern Beibu Gulf, China[J]. Journal of Ocean University of China (Oceanic and Coastal Sea Research), 2022, 21(3): 531-540.
- [8] Kwan B K Y, Un V K Y, Cheung S G, et al. Horseshoe crabs as potential sentinel species for coastal health: Juvenile haemolymph quality and relationship to habitat conditions[J]. Marine and Freshwater Research, 2018, 69(6): 894-905.
- [9] Sekiguchi K, Yamamichi Y, Seshimo H, et al. Normal development[M]// Sekiguchi K. Biology of Horseshoe Crab. Tokyo: Science House Co. Ltd., 1988: 133-192.
- [10] Xu P, Bai H W, Xie X Y, et al. Tri-spine horseshoe crab aquaculture, ranching and stock enhancement: Perspectives and challenges[J]. Frontiers in Marine Science, 2021, 8: 608155.
- [11] Zhong Y M, Weng Z H, Wang Z T, et al. Artificial breeding of *Tachypleus tridentatus* indoors and the identification and control of common pathogens for fertilized egg and larvae[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2023, 30(6): 799-811. [钟赞民, 翁朝红, 王志婷, 等. 中国鲎室内人工繁育和鲎卵、幼体常见病病原鉴定及其防治[J]. 中国水产科学, 2023, 30(6): 799-811.]
- [12] Zhu J H, Wu Z, Feng B B, et al. Global conservation of *Tachypleus tridentatus*: Present status and recommendations[J]. Biodiversity Science, 2020, 28(5): 621-629. [朱俊华, 吴宙, 冯炳斌, 等. 全球中华鲎资源保护现状及对策建议[J]. 生物多样性, 2020, 28(5): 621-629.]
- [13] Carmichael R H, Rutecki D, Valiela I. Abundance and population structure of the Atlantic horseshoe crab *Limulus polyphemus* in Pleasant Bay, Cape Cod[J]. Marine Ecology Progress Series, 2003, 246: 225-239.
- [14] Botton M L, Loveland R E, Tiwari A. Distribution, abundance, and survivorship of young-of-the-year in a commercially exploited population of horseshoe crabs *Limulus polyphemus*[J]. Marine Ecology Progress Series, 2003, 265: 175-184.
- [15] Dong L F, Xu M Z, Li S C, et al. Effects of temperature on growth, molting, energy, immune index and antioxidation of juvenile Chinese horseshoe crab, *Tachypleus tridentatus*[J]. Marine Environmental Science, 2023, 42(1): 104-110. [董兰芳, 许明珠, 李世才, 等. 温度对中国鲎幼鲎生长、蜕壳、能值、免疫指标和抗氧化能力的影响研究[J]. 海洋环境科学, 2023, 42(1): 104-110.]
- [16] Liang G Y. The research of artificial incubation of Chinese horseshoe crab[J]. Marine Sciences, 1987, 11(1): 40-47. [梁广耀. 中国鲎人工育苗的初步研究[J]. 海洋科学, 1987, 11(1): 40-47.]
- [17] Wang D X, Su Y Q, Wang J, et al. Influence of environmental factors on development of embryo and larvae in *Tachypleus tridentatus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2001, 8(3): 10-14. [王德祥, 苏永全, 王军, 等. 几种因子对中国鲎胚胎和幼体发育的影响[J]. 中国水产科学, 2001, 8(3): 10-14.]
- [18] Ehlinger G S, Tankersley R A. Survival and development of horseshoe crab (*Limulus polyphemus*) embryos and larvae in hypersaline conditions[J]. The Biological Bulletin, 2004, 206(2): 87-94.
- [19] Lee C N, Morton B. Experimentally derived estimates of growth by juvenile *Tachypleus tridentatus* and *Carcinoscorpius rotundicauda* (Xiphosura) from nursery beaches in Hong Kong[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2005, 318(1): 39-49.
- [20] Chen Y, Lau C W, Cheung S G, et al. Enhanced growth of juvenile *Tachypleus tridentatus* (Chelicerata: Xiphosura) in the laboratory: A step towards population restocking for conservation of the species[J]. Aquatic Biology, 2010, 11(1): 37-46.
- [21] Tsuchiya K. The history of horseshoe crab research and conservation in Japan[M]//Tanacredi J T, Botton M L, Smith D. Biology and Conservation of Horseshoe Crabs. Cham: Springer, 2009: 559-570.
- [22] Mishra J K. Larval culture of *Tachypleus gigas* and its molting behavior under laboratory conditions[M]//Tanacredi J T, Botton M L, Smith D. Biology and Conservation of Horseshoe Crabs. Cham: Springer, 2009: 513-519.
- [23] Schreiber M P, Zarnoch C B. Aquaculture methods and early growth of juvenile horseshoe crabs (*Limulus polyphemus*)[M]//Tanacredi J T, Botton M L, Smith D. Biology and Conservation of Horseshoe Crabs. Cham: Springer, 2009: 501-511.
- [24] Jegla T C, Costlow J D. Temperature and salinity effects on developmental and early posthatch stages of *Limulus*[J]. Progress in Clinical and Biological Research, 1982, 81: 103-113.
- [25] Cheng P, Zhou A N, Huo S F, et al. Study on adaptability to different environment for juvenile of horseshoe crab, *Tachypleus tridentatus* with artificial incubation[J]. Journal of Xiamen University (Natural Science), 2006, 45(3): 404-408. [程鹏, 周爱娜, 霍淑芳, 等. 中国鲎人工培育的幼体对不同环境适应性的研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2006, 45(3): 404-408.]

Effects of temperature on molting and survival of larval and juvenile *Tachypleus tridentatus*

WENG Zhaohong^{1,2}, CHEN Ruifang³, XIE Yangjie^{1,2}, CHEN Zhi⁴, ZHONG Yunmin^{1,2}, ZANG Haonan^{1,2}, WU Siying^{1,2}

1. State Key Laboratory of Mariculture Breeding, Fisheries College of Jimei University, Xiamen 361021, China;
2. Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Xiamen 361021, China;
3. Guangxi Marine Biological Germplasm Resources Utilization Technology Innovation Center, Guangxi Academy of Sciences, Beihai 536000, China;
4. Fujian Freshwater Fisheries Research Institute, Fuzhou 350002, China

Abstract: The resources of *Tachypleus tridentatus* face the risk of depletion owing to habitat destruction and overfishing. Implementing artificial cultivation of large-sized juveniles and releasing them into suitable breeding grounds is an effective measure for restoring the population of *T. tridentatus*. This study used a self-designed cultivation system to rear horseshoe crab larvae and juveniles under controlled laboratory conditions. The impact of four distinct water temperatures (25, 28, 31, and 34 °C) on molting rates, molting duration, and mortality rates of various instar stages was compared. After 120 days of cultivation, there were no significant differences in the total survival rates of larval and juvenile horseshoe crabs across different temperature groups ($P>0.05$). However, higher water temperatures significantly facilitated the molting of larval and juvenile horseshoe crabs. At the end of the experiment, most of the juveniles in the 34 °C group had transitioned to the 4th instar stage, with a few individuals having already progressed to the 5th instar stage. In contrast, most individuals in the 31 °C group were observed to be at the 4th instar stage. In the 28 °C group, a predominant number were observed at the 3rd instar stage, with a few individuals progressing to the 4th instar. Within the 25 °C group, most individuals were observed at the 2nd instar stage, with only a few progressing to the 3rd instar. During the experimental period, the mortality rate of the 1st instar larvae ranged from 6.00% to 19.33%. Among them, the mortality rate of the 1st instar larvae in the 25 °C temperature group was significantly higher than that in the 31 °C and 34 °C groups ($P<0.05$), while no significant difference was observed among the other temperature groups ($P>0.05$). The mortality rates of the 2nd to 4th instar juveniles were not significantly different among the various temperature groups ($P>0.05$). Significant differences were observed in the earliest molting times of the 1st instar stages among the various temperature groups ($P<0.05$), with a noticeable trend of an earlier onset of molting at higher water temperatures. The development time required for each instar stage during the 2nd and 4th stages was estimated to range between 27 and 43 days, based on the weighted average time and earliest molting time of each instar stage, under temperatures ranging from 25 °C to 34 °C. The influence of temperature on the development time of the 1st instar larvae was greater than that of the 2nd and subsequent instar juveniles. The comprehensive analysis indicated that increasing the temperature within the appropriate range can effectively promote the molting of *T. tridentatus*, both 31 °C and 34 °C can achieve excellent cultivation effects. These results suggest that large-scale indoor cultivation of large juvenile horseshoe crabs is feasible. Additionally, it is advisable to rear the larvae at higher temperatures immediately after hatching to facilitate their development into the 2nd and subsequent instars as quickly as possible, thereby preventing them from entering a diapause state at low temperatures.

Key words: *Tachypleus tridentatus*; larva; juvenile; temperature; cultivation

Corresponding author: XIE Yangjie. E-mail: yjxie@jmu.edu.cn