

# 中华绒螯蟹多倍体的诱导研究

## I. 细胞松弛素 B 诱导中华绒螯蟹三倍体和四倍体胚胎

陈立侨 赵云龙 王玉凤 陈 魏 唐灵燕 堵南山 赖 伟  
(华东师范大学生物系, 上海 200062)

**摘 要** 采用细胞松弛素 B (C. B) 处理法, 研究了诱导中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 三倍体、四倍体的可能性和处理条件。实验所用 C. B 浓度为 0.5~2.0mg/L, 处理的起始时间分别在受精后 10~25min (诱导三倍体) 和 8.5~9.8h (诱导四倍体), 处理的持续时间为 10~25min。三倍体的适宜诱导条件为卵子在受精后 15min, 浓度为 1.5mg/L 的 C. B 溶液处理 18min。三倍体诱导率最高可达 58.18%。根据诱导三倍体的适宜 C. B 处理浓度和处理时间, 用 1.5mg/L C. B 溶液处理卵子 18min, 获得了 29.46%~57.89% 的四倍体胚胎。另外, 还对中华绒螯蟹三倍体、四倍体胚胎的诱导技术、诱导参数对胚胎发育的影响等有关问题进行了分析讨论。

**关键词** 中华绒螯蟹, 胚胎, 三倍体, 四倍体, 细胞松弛素 B 处理

中华绒螯蟹(河蟹)是我国特有的水产珍品, 它以优良的生物学品质、高营养价值、独特的风味享誉国内外, 并成为我国出口创汇的重要产品之一。近年来, 因环境污染、兴修水利和过度捕捞等原因, 河蟹自然资源日渐枯竭, 因此, 进行了蟹苗放流和小水体人工养殖。放流虽有一定效果, 但管理困难, 产量无法保证; 而小水体的人工培育, 普遍存在一龄蟹性成熟和二龄蟹育成规格小两大难题, 同时, 部分逃逸的一龄性成熟和二龄小规格蟹参与河蟹种群, 将导致种质退化、变异。小水体培育的蟹种群性成熟提前和个体趋向小型化, 究其原因, 是因为小水体养殖时, 环境单纯, 得不到充分生长发育所需的条件。为了从根本上解决上述的一系列难题, 培育出生长快的大规格河蟹新品种, 我们应用细胞工程技术开展了河蟹的多倍体诱导研究。

近二十年来, 水生动物多倍体育种技术出现了重大突破, 应用物理学方法、化学方法和生物学方法诱导水生动物多倍体, 在鱼类和贝类的研究中得到广泛的应用[楼允东 1984, Allen 等 1986, Bidwell 等 1985, Fujino 等 1987, Purdom 1983, Refstie 1977, Stanley 等 1981]。与鱼类、贝类相比, 十足类甲壳动物的多倍体育种起步较晚, 及对十足类动物自身的某些生殖生理学特殊性和细胞遗传学的研究极为缺乏, 使得该领域的研究进展不快, 至今仅对二种十足类即中国对虾和日本绒螯蟹 (*Eriocheir japonicus*) 进行过多倍体诱导实验和研究[包振民等 1993, Lu 等 1993], 而对我国重要的经济十足类河蟹的染色体组操作育种技术, 迄今尚无报道。本文报道了利用 C. B 处理诱导河蟹多倍体的情况。

## 1 材料与方法

### 1.1 亲蟹的培育与促产

试验用亲蟹分别于 1992、1993 年 10~11 月购于上海农贸市场, 体重 100~200 克, 附肢完

整,亲蟹先放在通气良好的淡水水泥池中,雌雄分开暂养。每个水泥池体积约为 $2\text{m} \times 2\text{m} \times 1\text{m}$ ,池中设置充足的拱形瓦片供蟹藏匿。依水温变化每1~2天投喂一定量除头去内脏的新鲜小杂鱼,每3~4天换去约1/2的水,使亲蟹在良好的饲养条件下充分发育成熟。2~3个月后,将雌雄蟹分别转入用于交配促产的玻璃缸中,各缸体积约 $30\text{cm} \times 60\text{cm} \times 30\text{cm}$ 。促产用的海水取自杭州湾,经2~3个月充分曝气后过滤沉淀,盐度10~12。实验开始时用控温仪使水温每天上升2~3℃,最终恒定在 $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ ,随即将雌、雄蟹合并于同一缸中,促使其交配。

## 1.2 产卵与授精

确证蟹交配后,旋即移走雄蟹,以避免其重复交配,影响雌蟹产卵,同时昼夜连续观察雌蟹的行为,等待产卵。进行三倍体诱导时,把即将或刚开始产卵的雌蟹解剖,从卵巢中取出未受精的生理成熟卵子,并从纳精囊内取出精液,进行半湿法授精,即将卵子与精液置于玻璃烧杯中充分摇混,授精2~3分钟后,受精卵用过滤海水漂洗2~3次,然后分别放入直径20cm的圆形聚丙烯网箱中,在 $20^\circ\text{C}$ 水温下的循环海水中孵化,精卵入水开始计时(受精零时)。诱导四倍体时,是让蟹自然产卵,把开始产卵的时间记为受精零时。

## 1.3 C. B 液配制

细胞松弛素 B(C. B) 为美国 Sigma 公司产品, C. B 液的配制是将 C. B 溶于二甲基亚砜(DMSO)中,再用重蒸水配成 $10\text{mg/L}$ 母液,置于 $4^\circ\text{C}$ 冰箱中保存。实验时用新鲜过滤海水(盐度12左右),将 C. B 配成浓度分别为0.5、1.0、1.5和 $2.0\text{mg/L}$ ,内含0.01% DMSO 的处理液。

## 1.4 C. B 液处理

三倍体诱导:将置于网箱中孵化的受精卵于受精后不同时刻(10~25min)分别放入浓度为 $0.5\sim 2.0\text{mg/L}$ 的 C. B 溶液中处理,到预定时间(10~20min)后,取出放回 $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ 海水中孵化,每个实验至少采用3个平行处理。各实验组及对照组用的受精卵数约为2000~3000粒。每次所用卵子均为同一雌蟹所产,对照组只用0.01%的 DMSO 处理,最后将对照组卵子洗净后放回海水中孵化。

四倍体诱导:自然顺产的蟹在 $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ 海水中培育至预定处理时间(8.5~9.8h),取出抱卵蟹,迅速用纸吸干蟹身上的水份。再用一块干净纱布置于蟹口前部和入水孔周围,轻轻打开脐盖,裸露粘附于腹部内肢刚毛上的卵子群,将腹部浸入 $1.5\text{mg/L}$ 的 C. B 溶液中处理18min,处理时应轻轻晃动蟹体,使刚毛上的卵子群能得到均匀和充分的处理。处理完毕后,将母蟹小心放回原培养缸中孵化。并取数个自然抱卵蟹在0.01% DMSO 中平行处理作对照。

## 1.5 存活率统计

观察网箱中孵化的受精卵和雌体所抱卵的胚胎发育情况[堵南山等1992],分别在囊胚期、原肠期取样,每组最少100个胚胎,分别统计各试验组和对照组胚胎不同时期的存活率。

## 1.6 染色体制片

采用多个胚胎混合染色体制片和单个胚胎染色体制片方法,分别在囊胚期(三倍体诱导)和原肠期(四倍体诱导)的不同阶段进行倍性鉴定,以略作改进的胚胎染色体制片法进行制片。先

用 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  秋水仙碱于 14~ 16  $^{\circ}\text{C}$  下培养 1~ 2h, 再用 0.1M 的 KCl 低渗液在 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴中低渗 40~ 50min, 然后小心移去低渗液, 缓慢加入预冷的卡诺氏固定液(3: 1 的甲醇和冰醋酸)在 4  $^{\circ}\text{C}$  下固定 1h 以上, 其间更换固定液 2~ 3 次, 后改用 1: 1 的甲醇和冰醋酸进行固定。制片时, 取数个或单个胚胎置于洁净的载玻片上, 滴上 1~ 2 滴 50% 醋酸使其软化并除去部分卵黄物质。常规空气干燥法制片, 日产 Olympus 显微镜下镜检并拍照。因河蟹染色体数较多(2n= 146), 确定倍数时, 一般以染色体数 146 左右的为二倍体, 219 左右的为三倍体, 292 左右的为四倍体。

## 2 结果

### 2.1 三倍体的诱导

#### 2.1.1 C. B 处理与三倍体率、囊胚期胚胎成活率的关系

试验表明, 用 C. B 处理受精卵诱导的三倍体胚胎, 其染色体数约为 219(图版 F1), 而对照组的染色体数约为 146, 均为二倍体(图版 F2)。组别 I, 受精后 10min 的受精卵用 1.5mg/L 的 C. B 溶液处理 18min, 三倍体率为 31.82%; 当受精后 15~ 20 min 处理时, 三倍体率较高, 分别达 51.61% 和 40.82%; 当受精后 25 min 时, 三倍体率则降至 20%。从囊胚期成活率的统计结果来看, 试验组囊胚期胚胎的成活率为 80.85%~ 85.23%, 与处理时刻的关系不明显, 但明显低于对照组的 91.95%(表 1)。

表 1 C. B 处理与三倍体率、囊胚期胚胎成活率的关系

Table 1 Relationship of cytochalasin B treatment with the rate of occurrence of triploidy and the survival rate of the embryos at blastula stage

组别	TA(min)	D(min)	D' (mg/L)	S <sub>1</sub> (%) (C <sub>1</sub> )	C <sub>2</sub>	3n(%)
I	10	18	1.5	82.24(107)	22	31.82
	15	18	1.5	80.85(92)	31	51.61
	20	18	1.5	85.23(88)	49	40.82
	25	18	1.5	83.54(79)	40	20.00
对照组	-	-	-	91.95(87)	42	-
II	15	10	1.5	87.25(102)	21	14.29
	15	15	1.5	85.84(113)	46	43.48
	15	18	1.5	84.69(98)	57	42.11
	15	20	1.5	75.76(99)	39	38.46
对照组	-	-	-	93.55(93)	37	-
III	15	18	0.5	87.84(74)	47	14.89
	15	18	1.0	84.47(103)	39	53.85
	15	18	1.5	80.90(89)	55	58.18
	15	18	2.0	73.12(93)	62	37.10
对照组	-	-	-	90.43(94)	42	-

注: TA 为处理时刻; D 为处理持续时间; D' 为 C. B 浓度; S<sub>1</sub> 为成活率= 囊胚期/ 受精卵; C<sub>1</sub> 为计数胚胎数; C<sub>2</sub> 为计数细胞数

组别 II 为受精后 15 min 的受精卵, 用浓度 1.5mg/L 的 C. B 溶液对受精卵进行不同时间处理, 三倍体的诱导率明显不同。当持续时间为 10min 时, 三倍体诱导率仅为 14.29%; 延长处理时间至 15、18 min, 三倍体率分别达到 43.48% 和 42.11%; 对受精卵处理 20 min, 三倍体诱导率为 38.46%。囊胚期胚胎成活率的统计结果表明, 成活率与处理持续时间呈反比关系, 说明处理时间的延长, 明显影响了受精卵和胚胎发育过程, 从而导致胚胎成活率的下降。组别 III, 为用不同

浓度 C. B 处理的结果。卵子受精后 15 min, 当持续处理为 18 min 时, 其三倍体的诱导率以 1.5mg/L 浓度组为最高, 占 58.18%; 浓度为 1.0 和 2.0mg/L 的浓度组, 则分别获得了 53.85% 和 37.10% 的三倍体; 而 0.5mg/L 组的三倍体诱导率仅为 14.29%。统计结果表明, 试验组囊胚期胚胎的成活率随 C. B 处理浓度的提高而有不同程度的下降, 且明显低于对照组。

### 2.1.2 对受精卵胚胎发育的影响

浓度为 0.5mg/L C. B 处理的实验组, 对受精卵正常卵裂的影响不大, 随着浓度的提高, 可观察到有部分进行第 3、4 次卵裂的受精卵, 卵细胞质逐渐突起, 在卵膜内形成大小不等的分裂球, 这种畸形分裂, 在 1mg/L 时出现较少, 而当浓度为 2.0mg/L 时, 约有 5% 的卵处于畸形分裂(图版 I 3)。畸形分裂胚胎极少能进入晚期囊胚, 往往在中途停滞发育而夭折。对照组的受精卵则未观察到有这种畸形分裂现象。

经比较观察, 在 20℃ 的孵化水温中, 各实验组的大部分胚胎的发育速度与对照组基本一致, 处理时间过长或浓度较高时, 也有受精卵发育停滞和畸形率增高的现象, 而对处理时刻的变化, 受精卵发育所受的影响差别不大。

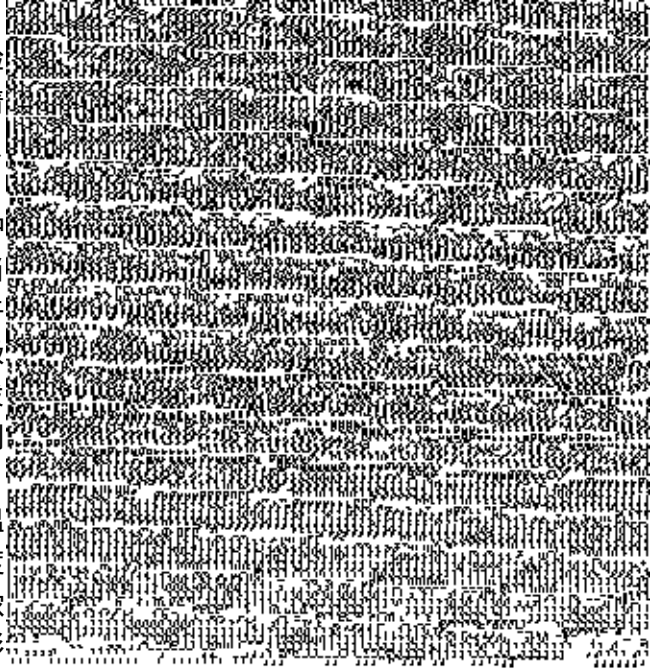
## 2.2 四倍体的诱导

### 2.2.1 C. B 处理与四倍体率、原肠期胚胎成活率的关系

经 1.5mg/L 浓度的 C. B 处理 18 min 的各试验组, 获得了不同比例的四倍体胚胎, 染色体数约为 292(图版 I 4), 四倍体的诱导率和原肠期胚胎成活率的结果(表 2)。从表 2 可见, 在 C. B 浓度和处理持续时间一定的条件下, 受精后不同时刻处理对四倍体的诱导率有明显影响。卵子受精后 8.5 h 开始处理, 四倍体诱导率仅为 29.46%; 以后每隔 20min 对不同抱卵蟹处理, 8.8 h 处理组的诱导率为 43.62%; 至 9.2、9.5 h 时, 诱导率较高, 分别达到 56.94% 和 57.89%; 再过 20min, 即受精后 9.8 h 开始处理, 四倍体诱导率则降至 35.29%。统计结果表明, 各实验组的原肠期胚胎成活率都较高, 与对照组无明显差异, 即处理时刻对原肠期胚胎成活率的影响不明显。

### 2.2.2 对受精卵胚胎发育的影响

试验表明, 试验组大部分受精卵发育速度比对照组滞后, 在较高 C. B 浓度的实验组中尤为明显, 如实验组的受精卵第一次卵裂时间, 比对照组滞后 1~3h, 而后随着胚胎发育的后移, 滞后现象越显著, 到原肠胚期时, 含高频率四倍体的处理组, 胚胎发育速度一般要滞后 10h 以上, 有的甚至可达 1~2 天, 但受精卵卵裂的同步率略高于对照组[赵云龙等 1993]。



图版 I 细胞松弛素 B 处理诱导三倍体、四倍体中华绒螯蟹

Plate I Triploidy and tetraploidy induction of the Chinese mitten-handed crab, *Eriocheir sinensis* by cytochalasin B

1. 以 1.0mg/L C. B 处理 10min 得到的三倍体胚胎细胞的染色体。
2. 对照组二倍体胚胎细胞的染色体。
3. 用 2.0mg/L C. B 处理后出现的畸形分裂胚胎。
4. 自然产卵受精后 9.2 小时, 用 1.5mg/L C. B 处理得到的四倍体胚细胞的染色体。

表 2 C. B 处理与四倍体率、原肠期胚胎成活率的关系

Table 2 Relationship between cytochalasin B treatment and the rate of occurrence of tetraploidy and the survival rate of the embryos at gastrula stage

组别	TA (h)	D (min)	D' (mg/L)	S <sub>1</sub> (%) (C <sub>1</sub> )	C <sub>2</sub>	4n (%)
实验	8.5	18	1.5	93.55(93)	112	29.46
	8.8	18	1.5	92.55(94)	94	43.62
	9.2	18	1.5	93.52(108)	72	56.94
	9.5	18	1.5	95.32(107)	76	57.89
	9.8	18	1.5	91.84(98)	51	35.29
对照	-	-	-	95.87(121)	72	-

注: TA 为处理时刻; D 为处理持续时间; D' 为 C. B 浓度; S<sub>2</sub> 为成活率= 原肠期/ 受精卵; C<sub>1</sub> 为计数胚胎数; C<sub>2</sub> 为计数细胞数

### 3 讨论

本研究应用 C. B 处理, 首次成功地诱导出河蟹的三倍体和四倍体胚胎, 这为河蟹的倍体性育种提供了可能。与鱼类、贝类和中国对虾的繁殖生理特性明显不同的是, 河蟹有抱卵孵化的习性, 脱离母体附肢的受精卵绝大部分难以顺利完成胚胎发育过程, 所以, 进行河蟹的多倍体诱导首先必须克服受精卵体外培养的困难。据报道, 在 20 °C 下, 河蟹的第一、第二极体的排放分别在受精后 40min 和 2~ 3h 之内完成[ Lee 1989], 在该时间段内, 受精卵一般未粘附牢固, 进行诱导处理易使受精卵脱落。所以采用自然产卵受精后粘附于雌体腹肢上的受精卵, 抑制其第一、第二极体的排放诱导三倍体尚有困难。为此, 我们把即将或刚开始产卵的雌蟹施行人工授精, 在诱导三倍体的过程中, 对各参数进行梯度试验, 以求得合适的诱导浓度和持续处理时间。然后, 再把这些参数应用于四倍体试验, 这样就可大大节省试验材料和时间, 并提高了效率。由于河蟹卵子受精后约 9h 才进入第一次成熟分裂中期[ Lee 1989], 这时受精卵已较牢固地粘连于母体的附肢上, 若把受精卵连同母体腹部一起浸泡处理, 而让头胸部露出处理液外, 这样不但受精卵不易脱落, 而且对雌蟹的毒害作用也不大, 可以继续抱卵孵化。这种连同母体一起浸泡的整体处理法不仅简便易行, 而且对于大规模生产多倍体也有较大的应用价值。

相对于温度休克而言, C. B 法诱导抱卵蟹的刺激较小, 不易使受精卵脱落。同时, 有研究者认为 C. B 比温度和压力等物理因素可诱导出较高比例的多倍体[ Downing 和 Allen 1987], 因为 C. B 的诱导机理是抑制细胞膜微丝网状系统的形成, 细胞不能进行分裂, 但不影响细胞内的核分裂。而温度和压力是同时抑制微丝和微管, 这既阻止染色体运动, 又阻止细胞分裂, 因此, 用温度和压力处理, 也许停止了全部发育。本试验中, C. B 处理诱导最高三倍体率、四倍体率分别为 58.10% 和 57.89%, 虽略高于温度休克的 50.00% 三倍体率和 52.69% 四倍体率(陈立侨等 1995), 这除与未能完全摸清处理时刻、持续时间和处理浓度三要素在内的优化处理条件外, 同时还与雌体成熟度、卵子质量差异以及处理操作速度等因素有关。

对不同动物来说, 开始处理时刻、浓度大小和处理时间三个参数的优化组合是不同的, 且它们之间相互关联, 缺一不可。若开始处理的时刻过早, 在受精卵由成熟分裂中期向后期启动时诱导, 会阻断成熟分裂的启动, 或直接影响卵子的激动和修整过程, 使其不能正常发育孵化。

但如延误了开始处理的时间,则达不到保留第一极体的目的,不但不能获得三倍体,而且 C. B 对受精卵具有损伤作用。本研究的三倍体诱导中,在受精后 25min 才处理时,三倍体率则大大下降,仅为 20%;四倍体诱导中,处理起始时刻早于受精后 8.8h 或晚于受精后 9.8 h 时,四倍体诱导率都明显低于受精后 9.2~ 9.5 h 的处理组。已有的研究表明,适当降低孵化温度,可抑制或减缓受精卵的卵裂速度[赵云龙 1993],从而有可能因延长了诱导染色体加倍的效应期,而提高四倍体诱导率。与此同时,浓度大小和处理时间也较为重要,浓度较低(0.5 mg/L)或处理时间较短(10 min),大部分受精卵的第一极体没有留住,三倍体诱导率低。但当处理时间延长至 20min 或浓度增大到 2.0mg/L 时,不但三倍体率明显下降,而且染色体的非整倍体增多,畸形胚胎增多,成活率则显著下降,这在贝类和中国对虾的多倍体诱导研究中也曾发现有类似的情况[包振民等 1993, Stanley 等 1981, Downing 和 Allen 1987, Allen 等 1982]。

水生动物多倍体育种的研究,在鱼类和贝类方面已做了大量工作,但对蟹类染色体组操作的研究则是刚刚开始。任何预期可育的四倍体,都有可能与正常二倍体交配而获得三倍体。已知三倍体动物是不育的,这样就可使动物将用于性腺发育的营养物质转变为用于肌肉等的生长上,从而培养出个大而丰满的河蟹新品种,这对解决小水体人工培育河蟹个体小型化和群体性成熟提前的难题,保留我国河蟹的优质资源库和促进现代养殖业的发展,都具有重要的现实意义。

本研究为上海市青年科技启明星计划基金资助项目。

## 参 考 文 献

- 包振民等. 1993. 中国对虾三倍体的诱导研究 II: 细胞松弛素 B 处理. 海洋学报, 15(3): 101~ 105.
- 赵云龙等. 1993. 不同水温对中华绒螯蟹胚胎发育的影响. 动物学研究, 14(1): 49~ 53.
- 堵南山等. 1992. 中华绒螯蟹胚胎发育的研究. 甲壳动物学论文集(第三辑). 青岛海洋大学出版社. 128~ 135.
- 楼允东. 1984. 国外对鱼类多倍体育种的研究. 水产学报, 8(4): 344~ 356.
- Allen S K Jr, et al. 1982. Induced triploidy in the soft-shell clam: cytogenetic and allozymic confirmation. J. Hered. 73: 421~ 428.
- Allen S K Jr, et al. 1986. Performance of triploid pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). I. Survival, growth, glycogen content and sexual maturation in yearling. J Exp Mar Biol Ecol, 102: 197~ 208.
- Bidwell C A, Chisman C L, Libey G S. 1985. Polyploidy induced by heat shock in channel catfish. Aquaculture, 51(1): 25~ 32.
- Downing S L, Allen S K Jr. 1987. Induced triploidy in the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*, optimal treatment with cytochalasin B depend on temperature. Aquaculture, 61: 1~ 15.
- Fujino K et al. 1987. Temperature tolerance difference among normal diploid and triploid Pacific abalone. Bull Jpn Soc Sci Fish, 53: 15~ 21.
- Lee T H. 1989. Cytological observations on fertilization in the Chinese freshwater crab, *Eriocheir sinensis*, by artificial insemination (In Vitro) and incubation. Aquaculture, 76: 347~ 360.
- Lu R H, et al. 1993. An experiment on induction of triploidy in *Eriocheir japonicus hepuensis* Dai by heat treatment. Chin J Oceanol Limnol, 11(1): 21~ 24.
- Purdum C E. 1983. Genetic engineering by the manipulation of chromosomes. Aquaculture, 33(4): 287~ 300.
- Refstie T, Vassvik V, Gjerdem T. 1977. Induction of polyploidy in salmonids by cytochalasin B. Aquaculture, 10: 65~ 74.
- Stanley J G, Allen S K Jr, Hidi H. 1981. Polyploidy induced in the American oyster, *Crassostrea virginica*, with cytochalasin B. Aquaculture, 23: 1~ 10.

# STUDIES ON THE POLYPLOID INDUCTION IN THE CHINESE MITTEN-HANDED CRAB, *ERIOCHEIR SINENSIS*, I. INDUCTION OF TRIPLOIDY AND TETRAPLOIDY EMBRYOS IN *ERIOCHEIR SINENSIS* BY CYTOCHALASIN B

CHEN Li-Qiao, ZHAO Yun-Long, WANG Yu-Feng,

CHEN Wei, TANG Ling-Yan, DU Nan-Shan, LAI Wei

(Department of Biology, East China Normal University, Shanghai 200062)

**ABSTRACT** Induction of triploidy and tetraploidy in the Chinese mitten-handed crab, *Eriocheir sinensis*, was successfully carried out for the first time by administration of cytochalasin B (C. B) treatment to zygotes from January to April in 1992 and January to May in 1993 in Shanghai. Results of studies shows that the C. B treatment was feasible for this species in chromosome manipulation. In treatment with 0.5~2.0 mg/L C. B, begun at 10~20 min after insemination and treatments lasting 10~20min, the proportion of triploid embryo, as judged from chromosome counts, varied between 14.29% and 58.18% in this experiment. Following the results of triploidy induction, tetraploids were also produced by treatments for 18 min with 1.5 mg/L C. B prior to the first cleavage. The optimum C. B treatment for inducing tetraploidy appeared to be 9.2 and 9.5 h post-fertilization at 20°C, which yielded 56.94% and 57.89% tetraploids respectively. The results of observation and analysis of the effect of C. B treatment on the extent of embryo development were also discussed in this paper. Sterile triploids could potentially continue to moult and grow after reaching the mature age of the diploid crab. The successful induction of chromosome polyploidy in the crab has great scientific significance in conservation and modern breeding programs in this species.

**KEYWORDS** *Eriocheir sinensis*, Embryo, Triploid, Tetraploid, Cytochalasin B treatment