

**MATING SUCCESS AND SPERM PROFILE OF HYBRID TRIALS
ON MUD CRAB GENUS *Scylla*, *S. olivacea* (HERBST, 1796)
AND *S. tranquebarica* (FABRICIUS, 1798) THROUGH
NATURAL MATING AND *IN-VITRO* TECHNIQUE**

NOOR BAIDURI BINTI SHAIBANI

**Thesis Submitted in Fulfillment of the Requirement for the
Degree of Master of Science in the Institute of Tropical
Aquaculture
Universiti Malaysia Terengganu**

May 2014

Abstract of thesis presented to the Senate of Universiti Malaysia Terengganu
in fulfillment of the requirement for the degree of Master of Science.

**MATING SUCCESS AND SPERM PROFILE OF HYBRID TRIALS
ON MUD CRAB GENUS *Scylla*, *S. olivacea* (HERBST, 1796)
AND *S. tranquebarica* (FABRICIUS, 1798) THROUGH
NATURAL MATING AND *IN-VITRO* TECHNIQUE**

NOOR BAIDURI BINTI SHAIBANI

May 2014

**Main Supervisor : Associate Professor Mhd. Ikhwanuddin @ Polity
Bin Abdullah, Ph. D.**

Institute : Institute of Tropical Aquaculture

Mud crabs, *Scylla* spp. is one of the high quality seafood in Malaysia. This study was aimed to determine the mating success and sperm profile of hybrid trials between two mud crab species, genus *Scylla*; *S. olivacea* and *S. tranquebarica* through natural mating and *in-vitro* technique. Mud crab samples were collected from natural habitat of Perak, Kedah and Terengganu coastal water throughout the study period. The first objective of this study was to determine the mating success of hybrid trials by natural mating through the assessment of mating stage completion, mating duration and sperm deposition. Crab breeding was conducted in hatchery at Institute of Tropical Aquaculture, Universiti Malaysia Terengganu. Mature male and immature female crabs were allowed to mate naturally in fiberglass rearing tank provided with sufficient aeration and shelter. Hybrid and non-hybrid trials were done between *S. olivacea* and *S. tranquebarica*. Complete mating

stages (pre-copulation, copulation and post-copulation) were observed in all mating trials. Although non-hybrid trials show higher mating percentage (60.00% - 90.00%) compared to the hybrid trials (35.00% - 50.00%), both species show similar mating behavior. Mean duration of pre-copulation in non-hybrid trials were significantly higher than hybrid trials, but no significant difference on duration of copulation and post-copulation. Despite the difference in mating duration, dissection revealed the presence of spermatophores in the spermathecae of post-copulated females, which indicates that the mating were successful for both hybrid and non-hybrid trials. Collected spermatophores were used for the following objective.

The second objective was to investigate the success of hybrid trials by *in-vitro* technique through assessment of fertilization rate, size development of eggs and early embryonic development. Sperm from vas deference (VD) of male and spermathecae (ST) of female were used to fertilize Stage 4 ovaries. Sperm suspension in Ca-F saline were mixed into the ovary mass in petri dishes and agitated. Artificial seawater (ASW) and treated filtered seawater (FSW) were used as culture medium. Fertilized eggs were observed in all trials. Non-hybrid eggs that have been cultured in ASW show significantly higher fertilization rate (55.00%) as compared to FSW (48.33%). Meanwhile, hybrid eggs cultured in ASW show fertilization rate up to 45.00%. However, most trials (hybrid and non-hybrids) show declining in embryonic development rate as the number of days increased due to the deterioration of eggs. Abnormal embryonic developments were noticed from

Day 3 onwards. Although, fertilization of eggs through *in-vitro* technique was successful, hatching embryo could not be attained as the eggs only develop up to Day 5 embryo.

The last objective was to study the sperm profile of two mud crab species, *S. olivacea* and *S. tranquebarica* mating in wild and in captivity through the determination of spermathecal load (SL) in females, sperm reserve (SR) in males and description of the sperm activation stages by acrosomal reaction (AR). Mature male and female crabs from wild were dissected for wild samples. While, captive samples were resumed from the first objective. Collected spermathecae and vas deference were homogenized and stained. SL, SR and AR were determined by visual count. Both wild- and captive-mated females show that the SL has no significant relationship with their carapace width (CW). SR of male crabs also show similar pattern. Smaller crabs can possess more SL and SR than larger crabs. Both species have typical non-flagellated sperm. AR was defined into four stages. Stage 1 was an inactive sperm as they were visibly spherical. Stage 2 can be defined when slight expansion was visible at the acrosome region, in which the extrusion of acrosomal materials began. As the extrusion continues (Stage 3), expansion of the opening at the acrosome region enlarges and the acrosomal filament ejected from the acrosome region can be detected (Stage 4). High percentage (*S. olivacea*, 59.30%; *S. tranquebarica*, 70.20%) of Stage 1 AR were observed in male crabs. Wild-mated females show high percentage of AR in Stage 4 (*S. olivacea*, 71.80%) and Stage 3 (*S.*

tranquebarica, 68.80%). Meanwhile, AR in the captive-mated females were mostly in Stage 2 (*S. olivacea*, 53.50%; *S. tranquebarica*, 55.30%). Study on the mating success through natural mating and *in-vitro* fertilization of hybrid trials could clarified the possibilities for hybridization between two mud crab species in Malaysia, *S. olivacea* and *S. tranquebarica*. In addition, description of sperm profile has provided essential information for manipulation of sperm activation (AR) for artificial production of mud crab seeds in the future.

Abstrak tesis yang dikemukakan kepada Senat Universiti Malaysia Terengganu sebagai memenuhi keperluan untuk Ijazah Sarjana Sains.

**KEJAYAAN MENGAWAN DAN PROFIL SPERMA
TERHADAP PERCUBAAN KACUKAN KETAM NIPAH, GENUS *Scylla*,
S. olivacea (HERBST, 1796) DAN *S. tranquebarica* (FABRICIUS, 1798)
SECARA PENGAWANAN SEMULAJADI DAN TEKNIK *IN-VITRO***

NOOR BAIDURI BINTI SHAIBANI

Mei 2014

Penyelia utama : Profesor Madya Mhd. Ikhwanuddin @ Polity Bin Abdullah, Ph. D.

Institut : Institut Akuakultur Tropika

Ketam nipah, *Scylla* spp. merupakan salah satu makanan laut yang berkualiti tinggi di Malaysia. Kajian ini bertujuan untuk menentukan kejayaan mengawan dan profil sperma terhadap percubaan kacukan antara dua spesies ketam nipah, genus *Scylla*; *S. olivacea* dan *S. tranquebarica* secara pengawanan semulajadi dan teknik *in-vitro*. Sampel ketam nipah diperoleh daripada habitat semulajadi di perairan Perak, Kedah dan Terengganu sepanjang tempoh pengajian. Objektif pertama kajian ini adalah untuk menentukan kejayaan mengawan bagi percubaan kacukan secara pengawanan semulajadi melalui penilaian pencapaian peringkat mengawan, tempoh mengawan dan pemindahan sperma. Pembiakan ketam ini dijalankan di Hatcheri Institut Akuakultur Tropika, Universiti Malaysia Terengganu. Jantan matang dan betina tidak matang dibiarkan mengawan secara semulajadi di dalam tangki ternakan yang dilengkapi dengan

pengudaraan dan perlindungan yang cukup. Percubaan kacuk dan bukan-kacuk dilakukan antara *S. olivacea* dan *S. tranquebarica*. Peringkat mengawan yang lengkap (pra-kopulasi, kopulasi dan pos-kopulasi) dapat diperhatikan dalam semua percubaan. Walaupun percubaan bukan-kacuk menunjukkan peratusan mengawan yang lebih tinggi (60.00% - 90.00%) berbanding percubaan kacuk (35.00% - 50.00%), kedua-dua spesies menunjukkan kelakuan mengawan yang serupa. Purata tempoh pra-kopulasi bagi percubaan bukan-kacuk adalah ketara lebih tinggi berbanding percubaan kacuk, tetapi tiada perbezaan ketara bagi tempoh kopulasi dan pos-kopulasi. Walaupun terdapat perbezaan dalam tempoh pengawanan, kehadiran spermatofor dapat dilihat di dalam spermateka ketam betina peringkat pos-kopulasi, menunjukkan bahawa pengawanan untuk kedua-dua percubaan kacuk dan bukan-kacuk telah berjaya. Spermatofor yang diperolehi telah digunakan untuk objektif yang berikutnya.

Objektif kedua adalah untuk menyiasat kejayaan percubaan kacukan secara teknik *in-vitro* dengan menilai kadar persenyawaan, perkembangan saiz telur dan perkembangan awal embrio. Sperma daripada vas deferens (VD) jantan dan spermateka (ST) betina telah digunakan untuk mensenyawakan telur Peringkat 4. Suspensi sperma di dalam *Ca-F saline* telah dicampur ke dalam kelompok telur di dalam piring petri dan di goncang. Air masin buatan (ASW) dan air masin yang dirawat dan ditapis (FSW) digunakan sebagai media. Telur yang tersenyawa dapat diperhatikan dalam semua percubaan. Telur-telur bukan-kacuk yang dikultur di dalam ASW jelas menunjukkan kadar

persenyawaan yang tinggi (55.00%) berbanding FSW (48.33%). Sementara itu, telur-telur kacuk yang dikultur di dalam ASW menunjukkan kadar persenyawaan sehingga 45.00%. Walaubagaimanapun, kebanyakan percubaan (kacuk dan bukan-kacuk) menunjukkan penurunan kadar perkembangan embrio dengan pertambahan bilangan hari disebabkan oleh kemerosotan pada telur-telur tersebut. Perkembangan embrio yang tidak normal dapat diperhatikan bermula pada hari ke-3 dan seterusnya. Walaupun persenyawaan telur secara teknik *in-vitro* telah berjaya, penetasan embrio tidak dapat dicapai kerana telur-telur tersebut hanya berkembang sehingga embrio pada hari ke-5 sahaja.

Objektif terakhir adalah untuk mengkaji profil sperma dua spesies ketam nipah, *S. olivacea* dan *S. tranquebarica* yang mengawan di habitat liar dan secara ternakan dengan menentukan muatan spermateka (SL) di dalam betina, simpanan sperma (SR) di dalam jantan dan penghuraian tentang peringkat pengaktifan sperma oleh reaksi akrosom (AR). Ketam jantan dan betina yang matang daripada habitat liar dibedah untuk sampel liar. Sementara itu, untuk sampel ternakan, ia diteruskan daripada objektif pertama. Spermateka dan vas deferens yang diperolehi dihomogenasi dan diwarnakan. SL, SR dan AR ditentukan secara kiraan visual. Kedua-dua kumpulan betina, yang mengawan di habitat liar dan dalam ternakan menunjukkan tiada hubungan yang ketara antara SL dan lebar cengkerang (CW). SR bagi ketam jantan juga menunjukkan pola yang sama. Ketam yang lebih kecil boleh memiliki SL dan SR yang lebih banyak berbanding ketam

yang lebih besar. Kedua-dua spesies mempunyai sperma yang tiada flagella. AR telah didefinisikan kepada empat peringkat. Tahap 1 adalah sperma yang tidak aktif dan dapat dilihat berbentuk sfera. Tahap 2 boleh ditafsirkan apabila sedikit perkembangan dapat dilihat di bahagian akrosom, dimana pengeluaran kandungan akrosom bermula. Apabila pengeluaran tersebut berlanjutan (Tahap 3), bukaan pada bahagian akrosom akan semakin membesar dan filamen akrosom boleh dikesan (Tahap 4). Peratusan yang tinggi (*S. olivacea*, 59.30%; *S. tranquebarica*, 70.20%) pada Tahap 1 dapat diperhatikan dalam ketam jantan. Betina yang mengawan di habitat liar menunjukkan peratusan AR yang tinggi pada Tahap 4 (*S. olivacea*, 71.80%) dan Tahap 3 (*S. tranquebarica*, 68.80%). Sementara itu, AR dalam betina yang mengawan dalam ternakan kebanyakannya pada Tahap 2 (*S. olivacea*, 53.50%; *S. tranquebarica*, 55.30%). Kajian terhadap kejayaan mengawan secara pengawanan semulajadi dan teknik persenyawaan *in-vitro* bagi percubaan kacukan ini dapat menerangkan tentang kemungkinan untuk pengkacukan antara dua spesis ketam nipah di Malaysia, *S. olivacea* dan *S. tranquebarica*. Tambahan lagi, diskripsi profil sperma dapat memberikan informasi yang diperlukan untuk memanipulasikan pengaktifan sperma (AR) bagi penghasilan benih ketam nipah secara tiruan pada masa hadapan.