

THÔNG BÁO KHOA HỌC

**KHẢO SÁT HORMONE  $\beta$ -ECDYSONE TRONG PLASMA  
CỦA CUA LỘT (*Scylla paramamosain*)**

**DETECTION HORMONE  $\beta$ -ECDYSONE IN HEMOCYTE PLASMA OF PRE-MOLTING  
MUD CRAB (*Scylla paramamosain*)**

**Trần Thị Lệ Trinh<sup>1</sup>, Trần Văn Khanh<sup>1</sup>, Lê Hoàng<sup>1</sup>,  
Nguyễn Thành Trung<sup>1</sup>, Võ Thị Thùy Vy<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Kim Ngân<sup>1</sup>,  
Lý Hữu Toàn<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Ngọc Tĩnh<sup>1</sup>, Nguyễn Văn Nguyễn<sup>1</sup>**

Ngày nhận bài: 25/6/2019; Ngày phản biện thông qua: 10/8/2019; Ngày duyệt đăng: 22/8/2019

**TÓM TẮT**

Thí nghiệm được thực hiện đo hàm lượng  $\beta$ -ecdysone ( $C_{27}H_{44}O_7$ ) trong plasma máu cua - là tác nhân gây lột xác. Việc định lượng được hàm lượng  $\beta$ -ecdysone trong plasma sẽ giúp xác định được nồng độ nào sẽ ảnh hưởng lên sự lột xác của cua, giúp phát triển công thức thức ăn, đồng thời lựa chọn và sử dụng thức ăn giai đoạn lột đạt một cách hiệu quả.

Mẫu máu cua được trích tại khớp càng của cua (130-150g) đang nuôi tại Cần Giờ bằng kim tiêm đã chứa chất chống đông máu. Mẫu sau khi ly tâm 14000 vòng/phút,  $\beta$ -ecdysone trong plasma được làm sạch bằng cột SPE C18 trước khi tiêm vào máy HPLC. Pha động gồm MeOH:nước (60:40), pha tĩnh cột C18, bước sóng 244nm, tốc độ dòng: 0,5 ml/phút.

Kết quả cho thấy thời gian lưu của chất chuẩn  $\beta$ -ecdysone từ 7,7 đến 8,9 phút, đỉnh hấp thu xuất hiện ở phút 8,376. Sắc ký đồ của mẫu plasma cho thấy thời gian lưu từ 7,7 đến 8,9 phút, tương tự như thời gian lưu của chất chuẩn, đỉnh hấp thu tại 8,156 phút, hiệu suất thu hồi 89,43%. Hàm lượng  $\beta$ -ecdysone trong plasma đạt giá trị cao nhất là 45 ng/ml và thấp nhất là 20 ng/ml. Kết quả cho thấy việc xác định được hàm lượng của  $\beta$ -ecdysone trong máu cua có thể thực hiện bằng kỹ thuật phân tích HPLC.

Từ khóa: Sắc ký lỏng cao áp (HPLC), *Scylla paramamosain*,  $\beta$ -ecdysone.

**ABSTRACT**

The study evaluated  $\beta$ -ecdysone concentration ( $C_{27}H_{44}O_7$ ), which a major molting hormone, in crab hemocyte plasma of commercial softshell crab. Quantification of  $\beta$ -ecdysone level by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) will supported for utilization of suitability quality diet and regime feeding for molting crab stage.

Samples were collected in Can Gio farm, salinity at 15 ‰, the body weight of 5 crab samples ranges from 130 to 150g. Blood was drawn from the crab via cheliped by using a syringe contained 1-ml heparinized (citrate/EDTA anticoagulant). Samples were centrifuged at 14000 rpm in 15 minutes; the plasmas in supernatant were collected and stored at -30°C.  $\beta$ -ecdysone solutions were enriched through AccuBond SPE ODS-C18 columns and eluted with 5% methanol solvent. The extracts then were vacuum dried and diluted with 60  $\mu$ l methanol. Before injecting (20  $\mu$ l) into the HPLC, samples were filtered through a 0.22  $\mu$ m membrane. For analysis conditions, Ecosil C18 column was used for separating, mobile phase MeOH:water (v:v) in 60:40 ratio, flow rate 0.5 ml/min, wavelength 244 nm and oven at 40°C.

The retention time of  $\beta$ -ecdysone standard was in range of 7.7-8.9 min, peak reach at 8.376 min. In the chromatogram of crab blood plasma samples, peaks appear in range of 7.7-8.9 min, peak at 8.156 min, with 89.43% recovery efficiency. At the pre-molting period, the highest  $\beta$ -ecdysone content in hemocyte plasma was detected at 45ng/ml the crab and the lowest at 20ng/ml. The determination of  $\beta$ -ecdysone concentration in hemocyte plasma can help to select appropriate diets for effectively molting process and optimization feeding time.

Key words: High Performance Liquid Chromatography (HPLC), *Scylla paramamosain*,  $\beta$ -ecdysone.

<sup>1</sup> Viện Nghiên cứu nuôi trồng thủy sản II

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cua biển có tên tiếng Anh là mud-crab, green crab, hay mangrove crab, có nơi gọi là cua sen, cua lửa hoặc cua bùn. Theo Keenan (1999) và Macintosh và ctv (2002), cua biển phân bố ở vùng biển nước ta chủ yếu thuộc giống *Scylla* với các loài *Scylla paramamosain* (cua sen), *Scylla olivacea* (cua lửa), *Scylla serrata* (cua bùn) [7, 10]. *Scylla paramamosain* là loài cua bùn chiếm ưu thế trong hệ thống cửa sông ở đồng bằng sông Cửu Long [14], hiện nay được nuôi trong các trang trại nuôi trồng thủy hải sản tại miền nam Việt Nam. Đây là một loại thực phẩm không chỉ có giá trị kinh tế và xuất khẩu của Việt Nam mà còn có giúp cân bằng hệ sinh thái [1]. Chúng là loài rất có giá trị thương mại vì thể chúng được đánh bắt ở hầu hết các nước châu Á như Philipin, Indonesia, Việt Nam, Trung quốc, Đài Loan, Ấn Độ, Sri Lanka, Malaysia [5].

Trong vòng đời của mình, các loài giáp xác phải trải qua rất nhiều lần lột vỏ để phát triển từ trứng thành cua trưởng thành. Mỗi lần lột, lớp vỏ cứng tách ra thay vào là lớp vỏ mới khá mềm và cứng lên dần theo thời gian. Các sản phẩm cua, ghe, tôm lột vỏ có thành phần dinh dưỡng cao, đặc biệt là hàm lượng canxi và phosphor, và dễ hấp thu là những sản phẩm được ưa chuộng trên thị trường thế giới. Thịt cua lột có hàm lượng đạm rất cao từ 57,02 – 65,95%, hàm lượng khoáng từ 10,41 – 16,71% cao gấp hai lần cua chắt (7,01%); hàm lượng lipid của cua lột từ 3,52 -9,45% cũng cao hơn cua chắt rất nhiều (1,94%) [3]. Tuy nhiên, cua lột không đều và hiệu suất lột thấp là những trở ngại chính của quá trình nuôi sản xuất cua lột.

Hiện nay, có nhiều phương pháp khác nhau được sử dụng để kích thích sự lột vỏ của cua, ghe như sử dụng hóa chất, cắt cuống mắt hoặc sử dụng phương pháp tiêm hoặc bổ sung hooc môn vào thức ăn. Phương pháp sử dụng hóa chất không được khuyến khích sử dụng vì nó làm giảm chất lượng cua lột thương phẩm và ảnh hưởng đến sức khỏe người tiêu dùng. Nguyễn Thị Bích Thủy và ctv. đã nghiên cứu khảo sát sử dụng nhiều giải pháp khác nhau, bao gồm sử dụng các loại hooc môn, chitosan,

cắt cuống mắt, ... để thử nghiệm khả năng kích thích lột vỏ ghe xanh (blue swimming crab, *Portunus pelagicus*) [1]. Trong khi giải pháp cắt mắt cho thấy không có tác dụng rõ rệt lên hiệu quả lột vỏ của ghe, việc trộn 1% chitosan vào cá tươi làm thức ăn cho ghe hoặc 1ppm hooc-môn  $\beta$ -ecdysone vào thức ăn cho hiệu quả lột vỏ hơn 70% tài liệu tham khảo.

Ecdysteroid là một hooc-môn có thể kích thích việc lột xác và thúc đẩy chuyển từ giai đoạn trung gian đến giai đoạn tiền lột xác [10]. Soumoff (1983) và Skinner (1985) đã chỉ ra rằng hàm lượng ecdysteroid gia tăng trong giai đoạn tiền lột xác. Do đó, có thể sử dụng hooc môn ecdysteroid để thúc đẩy quá trình lột xác và rút ngắn thời gian lột xác [11, 12]. Về cơ bản, hàm lượng ecdysteroid trong máu của ở giai đoạn lột trung gian ở mức thấp (5ng/ml) và tăng rõ rệt trong giai đoạn tiền lột xác (44 ng/ml) [10, 12]. Kết quả nghiên cứu của Sorach và ctv (2013) cho thấy chu kỳ lột vỏ của ghe xanh (*P. pelagicus*) giảm đáng kể khi tiêm hooc môn phytoecdysone- là ecdysteroid được chiết xuất từ thực vật có tác dụng kích thích sự lột xác ở các loài chân khớp. So với mẫu cua không được tiêm hooc môn, mẫu cua được tiêm hooc môn có chu kỳ lột xác được rút ngắn hơn tới 43% [13].

Cho đến nay, thông tin về liều lượng hooc-môn và giai đoạn thích hợp để sử dụng hooc môn trong lĩnh vực nuôi và sản xuất cua lột thương phẩm vẫn chưa được nghiên cứu/ công bố. Dùng hooc-môn quá liều có thể dẫn đến việc kích thích quá độ của chu kỳ lột xác và cuối cùng có thể gây chết cho cua. Ngược lại, nếu không cung cấp đủ liều, tác dụng gây lột xác của hooc-môn sẽ thấp, dẫn đến việc cua không thể lột xác theo ý muốn. Việc định lượng được hàm lượng hooc-môn  $\beta$ -ecdysone trong máu có ý nghĩa quan trọng trong những nghiên cứu sử dụng hooc-môn kích thích lột xác hiệu quả trên cua và các loài giáp xác. Bằng việc định lượng này, có thể khảo sát được nồng độ hooc-môn  $\beta$ -ecdysone trong máu cua ở những giai đoạn khác nhau trong suốt chu kỳ lột vỏ của cua. Từ đó giúp ích cho việc lựa thức ăn có bổ sung hooc-môn  $\beta$ -ecdysone với nồng độ

thích hợp để sử dụng trong nuôi sản xuất của lột thương phẩm. Hiện nay không có nhiều phương pháp được sử dụng để định lượng hooc môn  $\beta$ -ecdysone. Một phương pháp phổ biến và hiệu quả được sử dụng là kỹ thuật sắc ký với thiết bị sắc ký lỏng cao áp (HPLC). Các nhóm nghiên cứu đã thực hiện nghiên cứu định tính và định lượng hooc môn trên mẫu sinh học [8] và  $\beta$ -ecdysone trên ghe xanh (*Callinectes sapidus*) [6] cho thấy đã chuẩn hóa được phương pháp phát hiện bằng HPLC pha đảo.

Việc bổ sung hooc-môn  $\beta$ -ecdysone vào thức ăn hoặc tiêm trực tiếp vào máu nhằm kích thích quá trình lột xác của các loài giáp xác nói chung và cua nói riêng vẫn còn là một vấn đề cần được nghiên cứu nhiều hiện nay. Hàm lượng sử dụng trong thức ăn và tích lũy trong cơ thể bao nhiêu là phù hợp để có thể kích thích lột xác hiệu quả mà không ảnh hưởng đến tỷ lệ sinh trưởng và tỷ lệ sống của chúng đang là vấn đề cần được nghiên cứu sâu hơn. Việc xác định được hàm lượng  $\beta$ -ecdysone trong plasma và thức ăn sẽ là công cụ hỗ trợ hiệu quả cho những nghiên cứu liên quan đến loại hooc-môn này. Tuy nhiên, vẫn chưa có nghiên cứu nào được thực hiện để đưa ra một phương pháp có thể sử dụng phân tích được hàm lượng  $\beta$ -ecdysone trong plasma cũng như trong thức ăn của cua ở nước ta hiện nay. Do đó nghiên cứu thiết lập qui trình định lượng  $\beta$ -ecdysone trên máu của hàm lượng làm công việc này.

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Vật liệu nghiên cứu

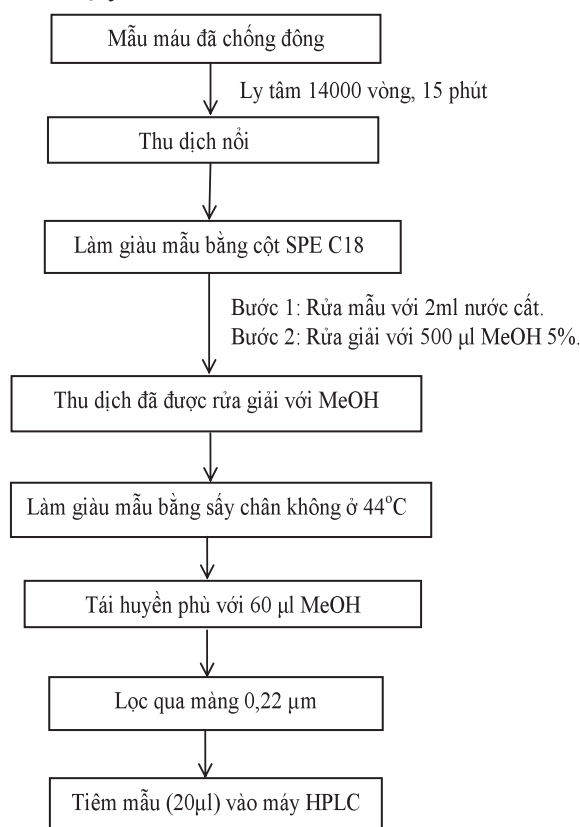
Cua biển (*Scylla paramamosain*) được nuôi tại Cần Giờ có kích thước trung bình khoảng 130 – 150g, số lượng thí nghiệm là 5 cá thể cua. Vì lượng máu thu được từ mỗi cá thể chỉ đủ cho 1 mẫu phân tích nên trong nghiên cứu này chỉ có 5 mẫu.

Chất chuẩn  $\beta$ -ecdysone (Sigma, Đức) và các hóa chất phân tích khác dùng trong thí nghiệm này là loại tinh khiết dùng cho kỹ thuật phân tích sắc ký (Merck, Đức). Thí nghiệm được tiến hành tại Phòng thí nghiệm Phân tích chất lượng Thực phẩm và Dinh dưỡng Thủy sản - Trung tâm Công nghệ Thức ăn và Sau thu hoạch Thủy sản.

### 2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp thu mẫu máu: máu của được thu tại cùng một thời điểm để tránh những biến động có thể xảy ra. Chất chống đông citrate/EDTA được chuẩn bị và khử trùng theo phương pháp của Leonard (1985) [9]. Dùng bơm tiêm 1ml đã chứa sẵn 200  $\mu$ l chất chống đông này để hút máu của theo tỉ lệ chất chống đông: máu = 1:1. Sau đó, mẫu được lắc đều và cho vào eppendorf, bảo quản lạnh và ly tâm trong ngày.

Quy trình xử lý mẫu được thực hiện như sau



**Hình 1. Quy trình xử lý mẫu để xác định hàm lượng hooc-môn ecdysone trong máu của bằng HPLC**

Quy trình phân tích được điều chỉnh từ phương pháp xác định nhóm hooc-môn ecdysone của nhóm tác giả Lafont và Wilson (1990). Mẫu được phân tích trên thiết bị Shimadzu 10AP, điều kiện tiến hành như sau: pha động gồm hỗn hợp MeOH:H<sub>2</sub>O theo tỷ lệ 60:40; pha tĩnh sử dụng cột Ecosil C18 (Lubex, Nhật) (Size: 4,6 mm x 250mmL); đầu dò UV-Vis tại bước sóng 244 nm; nhiệt độ cột tại 40°C; tốc độ dòng 0,5

ml/phút; thể tích mẫu tiêm 20 $\mu$ l.

Các dung dịch chuẩn có nồng độ  $\beta$ -ecdysone khác nhau (0; 0,05; 0,10; 0,25 và 0,50ppm) được pha loãng từ dung dịch chuẩn gốc nồng độ 500ppm được tiêm vào máy HPLC (LC-10AT Shimadzu). Đường chuẩn và hệ số tương quan hồi quy tuyến tính giữa nồng độ và diện tích mũ  $\beta$ -ecdysone được xây dựng dựa trên năm điểm chuẩn nêu trên.

$\beta$ -ecdysone (ppm) = (nồng độ theo đường chuẩn \* hệ số pha loãng/ thể tích mẫu).

Việc đánh giá thu hồi được thực hiện bằng cách hút 100 $\mu$ l dung dịch chuẩn ở nồng độ 0,25ppm thay cho mẫu plasma và thực hiện xử lý tương tự quy trình xử lý mẫu plasma máu ở trên, với thể tích tái huyền phù là 200 $\mu$ l và sau đó tiêm

vào máy sắc ký để xác định hiệu suất thu hồi [2].

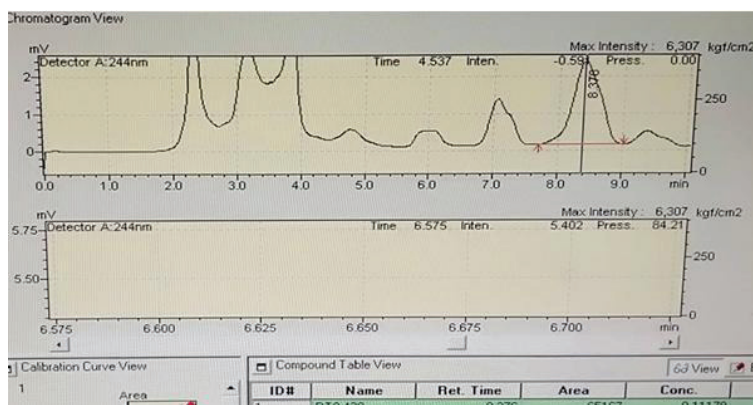
$H(\%) = \text{nồng độ } \beta\text{-ecdysone của mẫu thu hồi} * 100 / \text{nồng độ } \beta\text{-ecdysone chuẩn}$ .

### III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

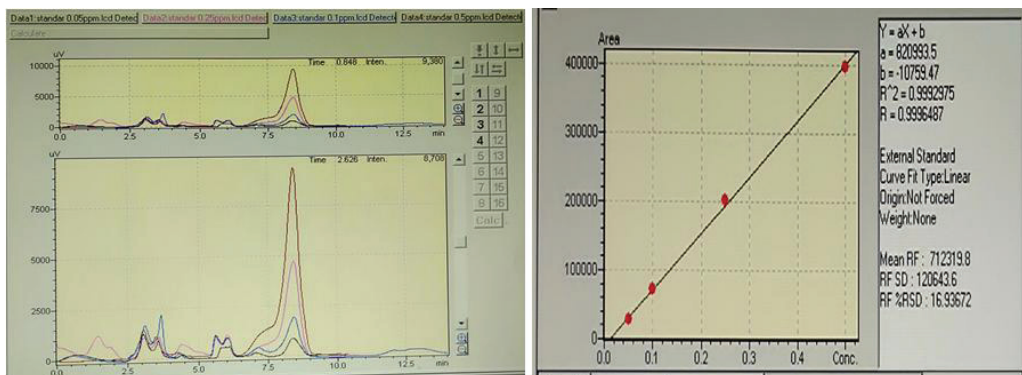
#### 1. Đường chuẩn

Kết quả phân tích sắc ký đồ của dung dịch chuẩn cho thấy thời gian lưu của mũ  $\beta$ -ecdysone kéo từ chân trái mũ hấp thu đến chân phải mũ hấp thu là 7,9-8,9 phút, đỉnh mũ hấp thu của  $\beta$ -ecdysone tại 8,376 phút.

Đường chuẩn tuyến tính trong khoảng nồng độ từ 0,05-0,50ppm cho phương trình hồi quy ( $y = 820993,5x + 10759,47$ ) có hệ số hồi quy tuyến tính cao  $R^2 = 0,9993$ .



Hình 2. Sắc ký đồ của dung dịch chuẩn



Hình 3. Sắc ký đồ của dung dịch chuẩn ở các nồng độ: 0,05; 0,10; 0,25; 0,50 ppm

Hình 4. Phương trình đường chuẩn  $\beta$ -ecdysone

#### 2. Đánh giá mẫu trắng và mẫu thu hồi

Từ kết quả xác định thời gian lưu và phương trình đường chuẩn  $\beta$ -ecdysone, xác định hiệu xuất thu hồi (Bảng 1) tại nồng độ 0,25ppm, thời gian lưu là 8,378 phút đạt 89,43%. Kết quả

này phù hợp với tiêu chuẩn AOAC (2007) [4] về đánh giá độ đúng trong thẩm định phương pháp phân tích. Theo tiêu chuẩn này, với nồng độ chất phân tích từ 100ppb đến 10ppm hiệu xuất thu hồi chấp nhận là từ 80-110%.

**Bảng 1. Kết quả điện tích mũi  $\beta$ -ecdysone của mẫu trắng và mẫu thu hồi**

Mẫu $\beta$ -ecdysone	Thời gian lưu (phút)	Nồng độ (ppm)
Mẫu trắng	KPH	0
Mẫu thu hồi (0,250 ppm)	8,376	0,22358

KPH: Không phát hiện

**3. Kết quả xác định nồng độ  $\beta$ -ecdysone trong mẫu máu của**



**Hình 4. Dung dịch mẫu plasma**

Sau khi ly tâm và lọc, mẫu plasma mang đi xác định trực tiếp hàm lượng  $\beta$ -ecdysone, cho thấy điện tích mũi sắc ký đồ của mẫu plasma nhỏ hơn nồng độ chuẩn thấp nhất của đường chuẩn (0,05ppm) (Hình 4). Do đó, sử dụng phương pháp bù chuẩn để xác định mũi chất cần phân tích và tính nồng độ  $\beta$ -ecdysone trong mẫu (Hình 5). Kết quả cho thấy rằng không có hiện tượng tách mũi khi bù chuẩn vào mẫu. Mũi  $\beta$ -ecdysone của mẫu plasma có thời gian lưu từ 7,9 phút đến 8,9 phút, đỉnh hấp thụ tại 8,156 phút.

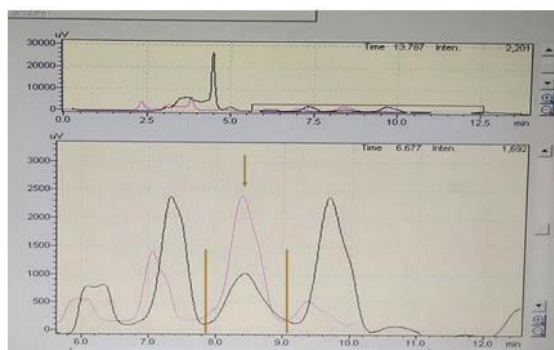
Năm mẫu cua tại Cần Giờ được lấy mẫu

**Bảng 2. Kết quả phân tích  $\beta$ -ecdysone trong một số mẫu máu của thu tại Cần Giờ**

Khối lượng cua (g)	Nồng độ $\beta$ -ecdysone (ppb)
131,56	45,7
138,58	23,6
149,00	29,1
130,00	31,8
130,00	20,0

**IV. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ**

$\beta$ -ecdysone trong mẫu máu cua có thể được xác định bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao với hiệu suất thu hồi 89,43% đạt yêu cầu độ thu hồi chấp nhận của tiêu chuẩn AOAC (80-110%).



**Hình 5. Dung dịch mẫu plasma bù chuẩn**

phân tích cho kết quả nồng độ  $\beta$ -ecdysone cao nhất là 45,7ppb và thấp nhất 20ppb. Kết quả này tương đương với quan sát được bởi Chung (2010) trên thiết bị HPLC-RIA khi khảo sát hàm lượng  $\beta$ -ecdysone - trong mẫu máu ở giai đoạn tiền lột xác đến trưởng thành từ mức 13ppb đến 71 ppb trên ghẹ xanh (*Callinectes sapidus*).

Trong nghiên cứu này, cua được đánh giá hàm lượng  $\beta$ -ecdysone có trọng lượng từ 130-150g, sự tương quan giữa hàm lượng  $\beta$ -ecdysone với khối lượng thân hay giới tính của cua cần được nghiên cứu, thu mẫu để đánh giá sâu hơn trong các nghiên cứu tiếp theo.

Đường chuẩn tuyến tính trong khoảng nồng độ khảo sát từ 0,05ppm đến 0,5ppm với hệ số tương quan tuyến tính  $R^2=0,9993$ . Nồng độ  $\beta$ -ecdysone trong những mẫu máu của được khảo sát đạt giá trị cao nhất là 45,7ppb và thấp nhất 20ppb.

Do hạn chế về thời gian và nguồn lực nên đề tài chưa thể đánh giá được các giá trị giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, độ lặp lại và tái lập của phương pháp. Nên kiến nghị khảo sát đánh giá thêm các thông số nêu trên và đồng thời khảo sát nồng độ  $\beta$ -ecdysone trong máu của ở các giai đoạn khác nhau trong suốt chu kỳ lột vỏ của cua và thực hiện phân tích với mức độ lặp lại cao hơn.

## LỜI CẢM ƠN

Chân thành cảm ơn Quỹ phát triển khoa học và công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh thuộc Sở Khoa học công nghệ Tp. HCM đã tài trợ kinh phí thực hiện nghiên cứu này theo hợp đồng thực hiện nghiên cứu khoa học và phát triển công nghệ số 178/2017/HĐ-SKHHCN ký ngày 20/10/2017.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

### Tiếng Việt

1. Nguyễn Thị Bích Thủy, Đinh Tấn Thiện, Lê Minh Vương, Nguyễn Ngọc Hà, Lê Văn Chí, Nguyễn Xuân Nam, Lê Vịnh, 2005. Nghiên cứu phương pháp kích thích đồng loạt lột xác ghẹ xanh (*Portunus pelagicus*) thương phẩm. Tạp chí thủy sản 21/11/2005-viện Nghiên Cứu Thủy Sản III.
2. Trần Cao Sơn, Phạm Xuân Đà, Lê Thị Hồng Hào, Nguyễn Thành Trung, 2010. Thẩm định phương pháp trong phân tích hóa học và vi sinh vật. Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật, 32-34.
3. Trần Ngọc Hải, Nguyễn Thanh Phương, Nguyễn Anh Tuấn, Phạm Minh Đức, 2006. Nuôi cua lột (*Scylla* sp.) trong hệ thống tuần hoàn với các loại thức ăn và mật độ khác nhau. Tạp chí Nghiên cứu Khoa học 2006, Trường Đại học Cần Thơ, 159-170.

### Tiếng Anh

4. AOAC International (2007). How to meet ISO 17025 requirement for method verification, USA.
5. Azra, M.N., Ikhwanuddin, M. 2016. A review of maturation diets for mud crab genus *Scylla* broodstock: Present research, problems and future perspective. Saudi journal of biological sciences, 23(2): 257-267.
6. Chung, J.S., 2009. Hemolymph ecdysteroids during the last three molt cycles of the blue crab, *Callinectes sapidus*: quantitative and qualitative analyses and regulation. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 73: 1-13.
7. Keenan, C.P., 1999. Aquaculture of the mud crab genus *Scylla* - past, present and future. Mud crab aquaculture and biology. in: Keenan, C.P., Blackshaw, A (Ed.), Proceedings of an international scientific forum held in Darwin, Australia. ACIAR Proceedings, 78, 216.
8. Lafont R., Wilson I.D., 1990. Advances in ecdysteroid high performance liquid chromatography. In: McCaffery A.R., Wilson I.D. (eds) Chromatography and isolation of insect hormones and pheromones. Chromatographic society symposium series. Springer, New York, NY, 79-94.
9. Leonard, C., Kenneth S., Norman A. R., 1985. Studies on prophenoloxidase and protease activity of blaberus cranifer haemocytes. Insect Biochemistry, 15(6): 803-810.
10. Macintosh, D.J., Overton, J.L., Thu, H.V.T., 2002. Confirmation of two common mud crab species genus *Scylla* in the mangrove ecosystem of the Mekong Delta, Vietnam. Journal of Shellfish Research, 21: 259-65.
11. Skinner, D.M., 1985. Interacting factors in the control of the crustacean molt cycle. American Zoologist, 25, 275-284.
12. Soumoff, C., Skinner, D.M., 1983. Ecdysteroid titers during the molt cycle of the blue crab resemble those of other Crustacea. The Biological Bulletin, 165: 321-329.
13. Sorach K., Boonyarath P., Peter J. H., and Suksamrarn A., 2013. Effects of phytoecdysone on the molting period and survival rate of the blue swimming crab (*Portunus pelagicus*). Journal of Science, Technology, and Humanities, 11(2): 87-94.
14. Ut, V.N., Le Vay, L., Nghia, T.T., Hong Hanh, T.T., 2007. Development of nursery culture techniques for the mud crab *Scylla paramamosain* (Estampador). Aquaculture Research, 38: 1563-1568.