

不同脂肪源饲料对中华绒螯蟹卵巢发育与繁殖性能的影响

刘立鹤^{1,2}, 陈立侨¹, 李康¹, 周永奎¹, 李二超¹

(1. 华东师范大学 生命科学院, 上海 200062; 2. 武汉工业学院, 湖北省饲料工程技术研究中心, 湖北 武汉 430023)

摘要:在基础饲料(CP 40%)中分别添加6%的鱼油、花生油、卵磷脂和猪油, 投喂中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*, 简称河蟹)28周, 以投喂冰鲜小杂鱼的河蟹为对照组, 研究投喂不同脂肪源饲料对河蟹卵巢发育和繁殖性能的影响。结果表明, 饲料脂肪源对河蟹的卵巢发育和繁殖性能影响显著, 鱼油组雌蟹的产卵力 $[2.787 \times 10^3 \text{ cell/g (Wt)}]$ 显著高于其他实验组, 卵磷脂组 $[2.216 \times 10^3 \text{ cell/g (Wt)}]$ 和对照组 $[2.041 \times 10^3 \text{ cell/g (Wt)}]$ 次之; 而鱼油、卵磷脂和对照组间雌蟹的受精率与孵化率无显著差异, 但均显著高于猪油和花生油组; 猪油组雌蟹的繁殖性能最差, 其产卵力与孵化率分别仅为鱼油组的56.9%和32.57%, 受精率也较鱼油组显著降低; 随着饲养时间的延续, 对照组河蟹肝体指数(HSI)逐渐下降, 而性腺指数(GSI)持续上升, III₁~III₂期增幅最大, III₂期雌蟹GSI值高达9.15, 显著高于同期其他实验组, 且同期血淋巴中卵黄蛋白原(Vg)的含量显著升高。与对照组不同, 各饲料组卵巢发育期的物质积累峰值主要发生在III₂~IV期, GSI峰值均出现在性腺发育的IV期, 磷脂组与鱼油组IV期的GSI最高, 分别为11.50和11.25, 花生油组次之(8.85), 猪油组最低(7.30); 猪油能明显提高河蟹性腺发育早期血淋巴中Vg的含量, 但当性腺成熟至IV期时, 除卵磷脂组外, 其他饲料组血淋巴Vg含量较III₂期显著降低, 且猪油组和对照组血淋巴中Vg含量显著低于其他饲料组。结果表明, III₁~III₂期是河蟹雌体肝胰腺营养物质向卵巢转移, 卵巢营养物质快速积累的时期, 且饲料脂肪源可通过影响卵巢中卵黄蛋白原等营养物质的合成和积累, 进而影响到河蟹卵巢发育和繁殖性能。综合比较, 卵磷脂也可以作为河蟹雌性亲体的优质饲料脂肪源。[中国水产科学, 2007, 14(5): 786-793]

关键词: 中华绒螯蟹; 脂肪源; 繁殖性能; 卵黄蛋白原; 卵巢发育

中图分类号: S963

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2007)05-0786-08

脂类是甲壳动物重要的营养物质和能量来源, Middleditch等^[1-2]首次用天然饵料揭示了不饱和脂肪酸对对虾成功繁殖的重要性, 随后的研究进一步证实了饲料中高水平的n-3 HUFA和18:2n-6能够提高罗氏沼虾繁殖力、卵的孵化率和后代的整体质量^[3-7]; EPA与DHA是合成甲壳动物卵正常发育和增殖的物质基础, 卵中EPA水平与亲虾产卵量, DHA水平与受精率和孵化率之间分别存在着正相关关系^[8-10]。大量研究表明, 脂类在甲壳动物性腺发育、生殖中起着极其重要的作用。

中华绒螯蟹(下称河蟹)(*Eriocheir sinensis*)是中国名优水产品, 已有河蟹脂类的研究主要集中在卵巢发育和肝胰腺脂类组成变化^[8,10-12]、对河蟹卵黄形成的过程和途径的探讨以及不同脂肪及与维生

素的交互作用对河蟹繁殖性能的影响^[13-15], 这些研究证实, 在河蟹性腺发育不同阶段, 脂肪及脂肪酸含量与组成变化非常明显, 尤其在性腺快速发育期卵巢中高度不饱和脂肪酸的含量(HUFAs)显著提高; 在自然条件下雌蟹的卵黄发生与营养物质在肝胰腺的积累及卵黄发生密切相关; 饲料中添加不同的脂肪源能显著影响雌蟹的繁殖性能, 且饲料中的HUFAs与维生素C、E间存在显著的交互作用。饲料中的脂肪源能否影响河蟹卵巢发育与营养物质的转运, 以及是否可进一步影响其繁殖性能, 至今仅有少量报道。因此, 深入研究不同饲料脂肪源对河蟹雌体肝胰腺与卵巢营养物质积累、转运及卵黄蛋白合成的影响以及由此而导致的对河蟹繁殖性能的影响, 将有利于在河蟹配合饲料的配制过程中对脂

收稿日期: 2006-12-30; 修订日期: 2007-04-12.

基金项目: 国家自然科学基金(30271012); 高等学校博士点专项基金(20040269011); 上海市优秀学科带头人计划项目(05XD14005); 上海市科委基础重大专项(06DJ14003); 浙江省重大科技攻关农业项目(2005C12006-01)。

作者简介: 刘立鹤(1972-), 男, 博士, 主要从事水产动物营养学研究。E-mail: Liulihe06@126.com

通讯作者: 陈立侨。Tel: 021-62233637; E-mail: lqchen@bio.ecnu.edu.cn

质资源进行合理化配制。同时也为河蟹生殖营养的深入研究提供必要的基础数据。

1 材料和方法

1.1 饲料配制和分组

应用等重替代原则,实验共配制了4种人工配合饲料(表1),饲料原料采用进口秘鲁蒸气鱼粉、宁波超星生物有限公司的鱿鱼内脏粉、河南红星啤酒厂的啤酒酵母和阿拉斯加天然鱼油和卵磷脂,其余

均为分析纯或生化级试剂。在基础配方中分别添加6%的鱼油、花生油、猪油和卵磷脂,记为1~4组。制粒前,各种原料粉碎后过60目筛,微量添加成分采取逐级扩大法混合均匀,用双螺旋挤条机制粒,风干后置于-20℃冰箱中冷冻保存备用。以Aglient 5890气相色谱检测饲料脂肪酸^[7],结果如表2所示。试验以投喂冰鲜小杂鱼的河蟹作为对照组,记为5组。

表1 不同脂肪源饲料配方

Tab.1 Composition of the experimental diets

%

成分 Composition	饲料 Diet			
	1	2	3	4
原料 Ingredients				
鱼粉 Peru fish meal	25	25	25	25
鱿鱼内脏粉 Squid viscera meal	6	6	6	6
啤酒酵母 Beer yeast	9	9	9	9
豆粕 Soybean meal	20.3	20.3	20.3	20.3
花生粕 Peanut meal	12	12	12	12
矿物质预混料 ^a Mineral premix ^a	1	1	1	1
维生素预混料 ^b Vitamin premix ^b	0.5	0.5	0.5	0.5
芬菜碱 Betaine	0.3	0.3	0.3	0.3
维C聚磷酸酯 VCPP (35%)	0.1	0.1	0.1	0.1
维E醋酸酯 VE actate (50%)	0.1	0.1	0.1	0.1
磷酸二氢钙 CaH ₂ PO ₄	0.5	0.5	0.5	0.5
三氧化二铬 Cr ₂ O ₃	0.1	0.1	0.1	0.1
氯化胆碱 Choline chloride	0.2	0.2	0.2	0.2
胆固醇 Cholesterol	0.2	0.2	0.2	0.2
高筋面粉 Starch	18.7	18.7	18.7	18.7
优质海鱼油 Fish oil	6	0	0	0
花生油 Peanut oil	0	6	0	0
猪油 Lard	0	0	6	0
卵磷脂 Lectin	0	0	0	6
营养成分 Nutritional composition				
粗蛋白/(%,DW) Crude protein	41.2	40.58	40.78	41.71
粗脂肪/(%,DW) Crud lipid	10.12	10.85	10.5	10.18
灰分/(%,DW) Ash	8.9	7.78	8.79	9.58
水分/% Moisture	9.19	9.15	9.12	9.32

注:^a河蟹矿物质预混料、^b维生素预混料配方组成参见文献[7]。

Note: The formulations of mineral premix and vitamin premix based on reference[7].

1.2 实验用蟹及饲养管理

实验蟹取自湖北洪湖,在3 m×3 m×2 m水泥池中暂养15 d后,挑选大小相当、体质量(50±5)g、附肢完整、体质健壮的河蟹,分为4组,每组4个平行,每个平行最初放蟹15只,放养于直径1 m的玻

璃缸桶中。对前2周死亡的蟹,称重后增补质量相当、个体健康的雌蟹。在玻璃缸桶中放置瓦片、隔热砖、PVC管用作河蟹的遮掩物,实验期间保持水位50~60 cm,河蟹爬到隔热砖面(40 mm×40 mm)上透气。实验期间投喂不同脂肪源饲料,对照组投喂

冰鲜小杂鱼,每天于 08:30、17:30 各投喂 1 次,1 h 将剩余残饵吸出,摄食量视天气、温度和摄食情况酌情增减。实验用水为蓄水池充分暴气后的自来水,除投喂、换水期间不充氧外,全程充氧,在自然水温,室内自然光照下进行。当水温高于 30 ℃,通过在蓄水池和桶外加冰来控制水温,整个实验用水 pH 7.4 ± 0.25, DO > 6 mg/L, NH₃-N < 0.2 mg/L, NO₂⁻-N < 0.01 mg/L。每日吸污、换水约 30%,每周清洗桶壁并彻底换水 1 次。养殖实验为期 28 周。

表 2 饲料脂肪酸的组成及含量

Tab.2 Profile and content of fatty acid in experimental diets

脂肪酸 Fatty Acid	饲料 Diet %			
	1	2	3	4
C _{14:0}	4.98	2.22	1.84	2.05
C _{16:0}	18.64	20.25	19.37	16.99
C _{16:1}	5.08	2.86	2.14	2.59
C _{18:0}	5.06	9.79	32.55	5.14
C _{18:1}	16.15	26.91	5.01	14.03
C _{18:2}	12.41	16.17	20.66	31.04
C _{18:3}	1.59	1.12	0.59	3.75
C _{20:0}	0.73	0.56	1.28	0.55
C _{20:1}	2.84	1.76	1.03	0.75
C _{20:4}	0.78	1.45	ND	0.60
C _{20:5} (EPA)	4.62	2.26	1.35	4.16
C _{22:0}	0.88	0.32	2.35	0.63
C _{23:0}	0.93	0.52	1.05	0.96
C _{24:0}	1.34	1.09	2.20	1.85
C _{22:6} (DHA)	4.88	2.98	1.65	5.72
C _{24:1}	0.67	0.27	0.43	0.45

1.3 取样与检测方法

1.3.1 取样 养殖试验开始前选择 40~60 只尚未发育的河蟹,取其性腺,依据薛鲁征等^[16]的卵巢发育分期标准将其判定为 I 期,作为实验的本底数据。养殖试验开始后,依据卵巢发育分期标准和性腺发育的大致时间,取试验所需的组织样品,每个处理组每期取样 6~8 只,将蟹准确称重后,用预冷的注射器插入第三步足膜内抽取血淋巴按 1:2 与抗凝剂混合,4 ℃,4 000 g 离心 10 min, -70 ℃ 保存待测。解剖蟹体取出的卵巢和肝胰腺,称重后分期保存于 -70 ℃ 超低温冰箱,待测。

1.3.2 繁殖性能评价指标 河蟹繁殖及评估指标

参考艾春香等^[15]的方法进行。28 周养殖试验后开始进行河蟹的人工繁殖。待雌蟹抱卵后,移走雄蟹,从每一试验组随机取 3 只抱卵雌蟹统计其卵粒数,计算产卵力,并将卵分类保存。将每只抱卵雌蟹放在单独一个玻璃缸中,桶中放水 32 cm 深左右,持续充氧,每 3 天换水 1 次。河蟹受精率的测定参考 Millamena 等^[17]的方法:转到孵化缸的雌蟹于抱卵后第 4 天和第 6 天,从抱卵蟹的不同部位取少量的卵(每个取样点约 0.1 g),统计受精卵数量(有色素积累和眼点形成的视为受精卵)。每天换水时用多重纱布过滤,检查有无䊗状幼体。待发现有䊗状 I 期幼体孵出时,将实验水体搅拌均匀后,每个实验处理组取 50 mL(取样 5 次),统计䊗状幼体的数量,同时将抱卵蟹轻轻擦干后,称重,置于另外一个配好盐水的玻璃缸桶中。持续 10 天后,参考艾春香等^[15]的方法计算孵化率。性腺指数(Gonadosomatic index, GSI)、肝体指数(Hepatopancreas somatic Index, HSI)、受精卵按照如下公式计算:性腺指数(GSI) = 100 × 卵巢湿质量/蟹体湿质量(g);肝体指数(HSI) = 100 × 肝胰腺湿质量(g)/蟹体湿质量(g);受精卵 = 100 × 有色素沉积和眼点卵的数量/单位质量卵的总数量。

1.3.3 卵黄蛋白原(Vg)的 ELISA 检测 Vg 浓度采用酶标记免疫吸附法进行测定,所采用的试剂、方法均与 Chen 等^[14]相同。具体步骤是:用 0.05 mol/L pH 9.6 PBS 稀释样品至适当浓度,包被酶标板,其中 4 孔不包被作为非特异性吸附对照,湿盒 4 ℃ 孵育过夜。倾去包被液,加入 1% BSA 封阻抗体的非特异性结合(每孔 100 μL),湿盒室温孵育 1 h,倾去 BSA, PBST 洗 3 次。加入适当稀释浓度的抗血清(每孔 100 μL),湿盒室温孵育 2 h,倾去抗血清, PBST 洗 3 次。将山羊抗兔 IgG-HRP(Sigma)用 PBST 以 1:10 000 稀释,加入各孔(每孔 100 μL),湿盒室温孵育 1 h,倾去二抗, PBST 洗 5 次,每次 5 min。在各孔中加入底物显色液(每孔 100 μL),轻轻摇晃,湿盒室温孵育。每孔加入 50 μL 终止液(2 mol/L H₂SO₄),酶标仪(德国 Bio-Tek ELx800)在 595 nm 处读数。经分离、Sephadex G-200 的凝胶层析柱,用聚丙烯酰胺凝胶电泳等方法纯化及鉴定的 Vg 制作标准曲线^[14,18-19]。

1.4 统计分析

数据以平均值 ± 标准差 ($\bar{X} \pm SD$) 表示。在单因素方差分析的基础上,采用 Duncan's 多重比较法

检验组间差异,差异显著度为 0.05。为使待分析数据呈正态分布,方差分析前将以百分比表示的数据转换为该数值的反正弦值。所有数据分析均使用 SAS system for Windows V8 软件包处理。

2 结果与分析

2.1 饲料脂肪源对雌蟹性腺指数(GSI)和肝体指数(HSI)的影响

对照组性腺发育 I~IV 期 GSI 持续上升,其中 I~III₁ 期 GSI 增长较平缓,但当性腺发育进入 III₂ 期时,GSI 显著升高到 9.15,产卵前的 IV 期 GSI 最高,达到 10.07,显著高于 I、II、III₁ 期 ($P<0.05$)。其他各饲料处理组 GSI 变化趋势与对照组基本相同,即随着性腺的发育,GSI 指数不断增长。对照组性腺发育相对较各脂肪源饲料组早,III₂ 期 GSI 即达到 9.15,远高于其他处理组,其中磷脂组 GSI 最低

为 1.85 ± 0.05 。进入性腺成熟 IV 期,猪油组 GSI 值最低 (7.3),其余由小到大依次为花生油组、对照组、鱼油组、磷脂组 (表 3)。

对照组 I~III₁ 期 HSI 没有显著变化,但 III₂ 期显著低于 III₁ 期,且产卵前后 HSI 亦未见显著差异 ($P>0.05$) (表 3)。而各饲料处理组 HSI 的变化趋势与对照组不同,没有呈现出持续下降趋势。猪油组 HSI 在 II 期便达到峰值 (9.51) 显著高于其他组 ($P<0.05$);磷脂组 HSI 在 III₁ 期达到峰值 8.23,而 III₁ 期猪油组为 7.04,显著低于同期鱼油组 (8.49) 和磷脂组 (8.23) ($P<0.05$),且各饲料处理组 HSI 均显著高于对照组 ($P<0.05$);待雌蟹性腺成熟 (IV 期) 时,各组 HSI 显著下降,猪油组 HSI 最低,仅为 3.18,其次为花生油 (4.48),而鱼油组的 HSI 最高,显著高于其他饲料组 ($P<0.01$) (表 3)。

表 3 饲喂不同脂肪源饲料的卵巢发育期雌蟹的性腺指数与肝体指数

Tab.3 GSI and HSI of *E. sinensis* fed different experimental diets during the ovarian maturation

$n\geq 3; \bar{X} \pm SD$

项目 Item	饲料 Diet				
	1	2	3	4	5
GSI					
I	0.14 ± 0.09	0.14 ± 0.09	0.14 ± 0.09	0.14 ± 0.09	0.14 ± 0.09
II	0.48 ± 0.24^b	0.46 ± 0.10^b	0.40 ± 0.12^b	0.41 ± 0.17^b	0.68 ± 0.22^a
III ₁	1.12 ± 0.84^a	0.44 ± 0.14^c	1.05 ± 0.40^{ab}	0.99 ± 0.38^{ab}	0.85 ± 0.23^b
III ₂	2.44 ± 0.05^b	3.09 ± 0.78^b	2.75 ± 2.09^b	1.85 ± 0.05^b	9.15 ± 1.53^a
IV	11.25 ± 1.00^a	8.85 ± 2.87^b	7.30 ± 2.09^c	11.50 ± 2.56^a	10.07 ± 2.40^a
HSI					
I	7.08 ± 1.83	7.08 ± 1.83	7.08 ± 1.83	7.08 ± 1.83	7.08 ± 1.83
II	7.14 ± 2.75^b	7.18 ± 1.41^b	9.51 ± 2.38^a	7.52 ± 1.74^b	6.76 ± 2.10^c
III ₁	8.49 ± 0.78^a	7.98 ± 0.14^{ab}	7.04 ± 0.97^b	8.23 ± 0.51^a	6.83 ± 0.72^c
III ₂	8.56 ± 0.43^a	8.13 ± 1.22^a	7.48 ± 0.82^b	7.99 ± 1.76^{ab}	5.61 ± 0.79^c
IV	6.72 ± 2.11^a	4.48 ± 0.18^c	3.83 ± 0.72^c	5.28 ± 1.32^b	5.03 ± 1.13^b

注:1,鱼油组;2,花生油组;3,猪油组;4,磷脂组;5,对照组。同行右上标字母不相同表示差异显著 ($P<0.05$)。

Note: 1, fish oil group; 2, peanut oil group; 3, pork lard group; 4, lecithin group; 5, control. Data with different letters in the same line are significantly different ($P<0.05$).

2.2 饲料脂肪源对雌蟹繁殖性能的影响

不同处理组蟹的繁殖性能指标如表 4 所示。可以看出,鱼油组产卵力最高,达到 2.787×10^3 cell/g 体质量,显著高于其他各饲料组 ($P<0.05$),而磷脂组和对照组显著高于花生油组和猪油组 ($P<0.05$)。对照组和鱼油组、磷脂组雌蟹的受精率与孵

化率均无显著差异,但此 3 个实验组显著高于花生油组和猪油组,其中猪油组产卵力约占鱼油组的 56.9%,且受精率,孵化率显著低于其他脂肪源饲料组 ($P<0.05$),其孵化率分别为鱼油组和对照组的 32.57% 与 30.36%,而且该组在繁殖期间曾出现流卵的现象。

表4 不同脂肪源饲料对雌蟹产卵力、受精率和孵化率的影响

Tab.4 Effect of different experimental diets on fecundity, fertilization rate and hatchability of *E. sinensis* $n \geq 5; \bar{X} \pm SD$

饲料 Diet	产卵力 / ($10^3 \text{ cell} \cdot \text{g}^{-1}$) Fecundity	受精率 / % Fertilization rate	孵化率 / % Hatching rate
1	2.787 ± 0.46^a	86.25 ± 3.22^a	75.75 ± 2.95^a
2	1.855 ± 0.53^c	81.75 ± 6.34^b	48.56 ± 10.9^b
3	1.585 ± 0.41^d	76.52 ± 5.89^c	24.67 ± 5.14^c
4	2.216 ± 0.62^b	86.03 ± 2.24^a	72.48 ± 6.50^a
5	2.041 ± 0.74^{bc}	85.21 ± 8.89^a	81.27 ± 9.12^a

注:1,鱼油组;2,花生油组;3,猪油组;4,磷脂组;5,对照组。同列右上标字母不相同表示差异显著 ($P < 0.05$)。Note: 1, fish oil group; 2, peanut oil group; 3, pork lard group; 4, lecithin group; 5, control. Data with different letters in the same column mean significantly different ($P < 0.05$).

2.3 饲料脂肪源与雌蟹血淋巴中 Vg 含量变化的关系

表5显示了各处理组河蟹性腺发育过程中血淋巴卵黄蛋白源的变化情况。河蟹性腺成熟过程中,对照组血淋巴中 Vg 含量不断升高,Ⅱ、Ⅲ₁期显著高于Ⅰ期,并于Ⅲ₂期达到峰值,显著高于其他性腺发育期 ($P < 0.05$);而当性腺成熟Ⅳ期,血淋巴 Vg 含量较性腺成熟前各期显著降低 ($P < 0.01$)。另外,饲料中添加不同脂肪源可明显影响河蟹性腺发育各期血淋巴 Vg 含量。Ⅱ期猪油组血淋巴 Vg 含量明显高于其他饲料组 ($P < 0.05$);而鱼油组最低,仅为 $35.75 \text{ ng}/\mu\text{L}$,显著低于其他处理组 ($P < 0.05$);至Ⅲ₁期时猪油组 Vg 含量仍明显高于其他饲料组 ($P < 0.05$),其他各处理组之间 Vg 含量未见显著差异 ($P > 0.05$);Ⅲ₂期鱼油组血淋巴 Vg 最高,

达到 $1331 \text{ ng}/\mu\text{L}$,磷脂组显著低于对照组和鱼油组 ($P < 0.05$),鱼油组显著高于猪油组 ($P < 0.05$),其他各组间血淋巴 Vg 并无显著差异 ($P > 0.05$);性腺成熟Ⅳ期磷脂组血淋巴 Vg 含量最高,显著高于其他各组 ($P < 0.05$),猪油组和对照组之间 Vg 含量未有显著差异 ($P < 0.05$),但是此两组均显著低于其他3个脂肪源组 ($P < 0.05$)。可见,河蟹血淋巴 Vg 含量随着性腺的发育逐渐增加,尤其是在卵细胞大生长期,性腺成熟后显著降低。但是投喂不同的脂肪源饲料河蟹血淋巴中 Vg 含量的变化并不完全一致。如猪油组在Ⅲ₁期即显著增加,而Ⅲ₁、Ⅲ₂期 Vg 含量基本持平,仅略有增加;而Ⅲ₂期后磷脂组河蟹血淋巴中 Vg 的含量持续增加,Ⅳ期 Vg 的含量显著高于其他处理组。

表5 不同脂肪源饲料对河蟹性腺发育过程中血淋巴卵黄蛋白原浓度的影响

Tab.5 Effects of different dietary lipid sources on vitellogenin content of hemolymph during ovarian maturation of *E. sinensis* $n = 6; \bar{X} \pm SD; \text{ng}/\mu\text{L}$

发育分期 Developmental stage	饲料编号 Diet				
	1	2	3	4	5
I	28.02 ± 2.89	28.02 ± 2.89	28.02 ± 2.89	28.02 ± 2.89	28.02 ± 2.89
Ⅱ	35.75 ± 1.51^d	69.42 ± 12.97^c	114.69 ± 7.58^a	93.07 ± 3.26^b	72.20 ± 2.78^c
Ⅲ ₁	65.16 ± 2.76^b	82.37 ± 11.81^b	963.7 ± 183.4^a	53.89 ± 2.32^b	77.21 ± 3.86^b
Ⅲ ₂	1331 ± 230.2^a	1096 ± 241.5^{abc}	976.2 ± 22.87^{bc}	866.3 ± 91.84^c	1216 ± 90.7^{ab}
Ⅳ	412.3 ± 54.28^b	265.1 ± 24.12^b	1.942 ± 0.78^c	1119 ± 205.4^a	1.77 ± 0.16^c

注:1,鱼油组;2,花生油组;3,猪油组;4,磷脂组;5,对照组。同行右上标字母不相同表示差异显著 ($P < 0.05$)。Note: 1, fish oil group; 2, peanut oil group; 3, pork lard group; 4, lecithin group; 5, control. Data with different letters in the same line are significantly different ($P < 0.05$).

3 讨论

3.1 脂质营养对河蟹性腺发育的影响

肝胰腺是甲壳动物主要的消化、代谢器官,同时

也是其能量贮藏器官。雌蟹性腺发育前,肝胰腺便会通过持续不断的积累营养,供后续卵巢发育之用。雌蟹性腺发育过程中,卵黄的发生方式有2种:一种是内源性卵黄发生,另一种是外源性卵黄发生。在

内源性卵黄发生过程中,卵黄物质来源于卵母细胞本身。而外源性卵黄发生,卵黄原料物质自卵细胞以外的地方合成,然后进入卵母细胞,这种机制对于卵母细胞在短时间内形成并积累大量的卵黄粒,具有特别重要的意义^[20]。在卵子发生早期,雌蟹的卵黄发生以内源性卵黄发生为主,而当河蟹性腺进入快速发育期,卵巢需要积累和消耗大量的能量和营养物质,此时河蟹卵黄发生主要以外源性卵黄发生为主。在性腺的快速发育期,甲壳动物的肝胰腺前期积累的营养物质便经血淋巴转移到卵巢,这种营养物质的转运方式在许多虾类研究中都得到了证实^[21]。河蟹在性腺发育过程中,由于肝胰腺中的营养物质通过各种途径(如 **Vg**)转运到卵巢,致使肝胰腺质量显著下降,所以河蟹的 **HSI** 值越来越小;与之相反,随着大量的营养物质转移到卵巢,使得河蟹 **GSI** 持续增加。这与 **Wen** 等^[8]及李思发等^[22]的研究结果基本一致。在河蟹性腺快速发育期,血淋巴 **Vg** 含量显著增加直接造成河蟹卵巢营养物质大量积累,这是促使 **GSI** 显著增加的重要原因^[14]。

本研究还表明,饲料中添加不同脂肪源能显著影响性腺发育过程中河蟹肝胰腺营养物质的积累。鱼油与花生油投喂组的 **HSI** 在性腺发育前期并未呈现下降的趋势,**Cahu** 等^[23]用配合饲料投喂凡纳滨对虾也发现类似的现象,这主要与肝胰腺营养积累与转运不同步有关。不同脂肪源饲料组性腺发育的Ⅲ₂至Ⅳ期,河蟹的 **HSI** 均显著降低,与此同时, **GSI** 显著增加,说明Ⅲ₂期是雌蟹营养转移、卵巢营养物质积累的高峰时期,雌蟹血淋巴中 **Vg** 含量在Ⅲ₂期显著升高也印证了这一点。因此,在Ⅲ₂期应进行脂质营养强化,可获得良好的生长和繁殖性能。此外,性腺发育过程中河蟹 **GSI** 逐渐提高,而各饲料处理组河蟹性腺发育及营养积累明显较对照组慢,造成这种差异的主要原因可能是对照组多为小杂鱼等,易于消化吸收,且杂鱼自身含有内源性激素,这些激素均可导致冰鲜组雌蟹性腺发育启动早于其他饲料组。

3.2 脂质营养对河蟹繁殖性能的影响

Djunaidah 等^[24]用不同的配合饲料投喂锯缘亲蟹,发现使用配合饲料能够成功地诱导雌蟹性腺成熟和产卵,但投喂配合饲料后亲蟹的繁殖性能并没有显著提高,相反孵化幼体的质量有所下降。而本研究与此结果相同,这表明,在人控条件下投喂配合

饲料,河蟹性腺能够发育成熟且成功繁殖,鱼油组和磷脂组蟹的部分繁殖性能指标甚至还优于对照组,因此,相对锯缘亲蟹而言,河蟹的养殖和繁殖更加容易。在虾类繁殖中,**Marsden** 等^[25]采用配合饲料(含有鲜鱼片)投喂斑节对虾亲体,获得了较好的繁殖性能。因此,通过对河蟹饲料进行优化,替代鲜活饵料是完全可行的。况且配合饲料具有营养全面、质量可靠、来源稳定、投喂方便、易贮存和运输、便于有效制剂的灵活添加等的优点,尤其是不易携带病毒、细菌病原体^[25],从而更有利于促进河蟹饲料的产业化。

已有研究表明,必需脂肪酸(**EFA**)的缺乏能抑制甲壳动物的蜕皮、生长,有些甲壳动物甚至因为必需脂肪酸,尤其是高度不饱和脂肪酸(**HUFA**)的缺乏,而致使亲体无法繁殖^[26-29]。本研究结果表明,饲料中仅添加猪油将导致河蟹繁殖性能低下,其产卵力只有鱼油组的一半,孵化率仅为鱼油组与磷脂组的1/3左右;而花生油组繁殖性能也较鱼油和磷脂添加组低。添加猪油饲料组 **DHA**、**EPA** 和 **18:3n-6** 分别只占饲料总脂含量的2.65%、2.35%和0.59%,而鱼油组此3种主要 **EFA** 含量分别为4.88%、4.62%和1.59%,卵磷脂组分别为5.72%、4.61%和3.75%,因此,本研究中猪油组和花生油组河蟹繁殖性能低下的主要原因极可能是 **EFA**,尤其是 **HUFA** 的缺乏和不足所致。鱼油和卵磷脂分属不同类型的脂类(分别为中性脂和极性脂),而河蟹繁殖性能并无显著差异,这说明对河蟹而言,饲料中脂肪酸的含量尤其是 **HUFA** 的含量较添加脂肪的类型更为重要。

3.3 饲料脂肪源对血淋巴 **Vg** 含量的影响

在本研究中,对照组血淋巴 **Vg** 含量在卵巢发育早期不断上升,卵巢成熟后(Ⅳ期)则显著下降,从而证实 **Vg** 的主要功能是作为河蟹营养素储存和转运的物质形式。河蟹性腺成熟后卵黄磷蛋白(**Lv**)便成为河蟹卵巢中主要具有活性的物质^[13,21]。**Vazquez-Boucard** 等采用酶联免疫检测方法测定了印度白对虾(*Fenneropenaeus indicus*)卵巢不同发育时期的肝胰腺、血淋巴和卵巢中 **Vg** 和 **Lv** 的含量,发现血淋巴 **Vg** 的变化也存在与此类似的变化规律^[28]。卵黄发生前普通褐虾(*Crangon crangon*)卵黄蛋白与肝糖含量明显增加,至卵黄发生期其血淋巴、卵巢和肝胰腺中 **Vg** 的含量仍继续上升^[29]。卵巢发育早期印度白对虾肝胰腺和血淋巴中 **Vg** 含量

不断上升,但至卵巢快速发育期后含量则显著下降^[28]。本试验的结果验证了以上的一些研究结论。

本研究结果表明,不同脂肪源饲料对河蟹血淋巴Vg有较明显的影响。Ⅱ、Ⅲ₁期猪油组血淋巴Vg含量显著高于其他脂肪源饲料组,说明饲料中添加猪油能够促进卵黄发生期Vg的转运,这可直接导致不同发育期肝胰腺和卵巢营养成分的变化。但猪油组的营养转运并没有直接反映在河蟹的宏观指标GSI上,这可能与河蟹Ⅱ、Ⅲ₁期发育时期相对较短,取样时间相对偏早有关。鱼油和磷脂在河蟹发育过程中血淋巴Vg含量尽管存在诸多类似,如Vg均在Ⅲ₂期显著升高,但其差异也是显而易见的,主要表现在,磷脂组Ⅲ₂期河蟹血淋巴Vg含量相对较低,Vg峰值出现在Ⅳ期,而鱼油Vg峰值出现在Ⅲ₂期,这从一个侧面说明磷脂能够更有效地“推迟”性腺发育时间,在河蟹强化培育中可通过适当添加磷脂的量,从而实现性腺的正常发育,进而改善性腺发育状况、提高河蟹的繁殖性能。

参考文献:

- [1] Middleditch B S, Missler S R, Hines H B, et al. Metabolic profiles of penaeid shrimp: dietary lipids and ovarian maturation [J]. Chromatography, 1980, 195: 359 – 368.
- [2] Middleditch B S, Missler S R, Ward D G, et al. Maturation of penaeid shrimp: dietary fatty acids [J]. Proc World Maricult Soc, 1979, 10: 472 – 476.
- [3] Cavalli R O, Lavens P, Sorgeloos P. Performance of *Macrobrachium rosenbergii* broodstock fed diets with different fatty acid composition [J]. Aquaculture, 1999, 179: 387 – 402.
- [4] Xu X L, Ji W J, Castell J D, et al. Effect of dietary lipids on fecundity, hatchability and egg fatty acid composition of Chinese prawn (*Penaeus chinensis*) [J]. Mar Fish Res, 1994, 13: 13 – 19.
- [5] 季文娟. 高度不饱和脂肪酸对中国对虾亲虾的产卵和卵质的影响 [J]. 水产学报, 1998, 22 (3): 240 – 246.
- [6] Xu X L, Ji W J, Castell J D, et al. Influence of dietary lipid sources on fecundity, egg hatchability and fatty acid composition of Chinese prawn (*Penaeus chinensis*) broodstock [J]. Aquaculture, 1992, 119: 359 – 370.
- [7] Wen X B, Chen L Q, Ai C X, et al. Reproduction response of Chinese mitten-handed crab (*Eriocheir sinensis*) fed different sources of dietary lipid [J]. Comp Biochem Physiol, 2002, 131A: 675 – 681.
- [8] Wen X B, Chen L Q, Ai C X, et al. Variation in lipid composition of Chinese mitten-handed crab, *Eriocheir sinensis* during ovarian maturation [J]. Comp Biochem Physiol, 2001, 131B: 95 – 104.
- [9] Teshima S, Kanazawa A, Koshio S, et al. lipid metabolism of the prawn *Penaeus japonicus* during maturation: variation in lipid profiles of the ovary and hepatopancreas [J]. Comp Biochem Physiol, 1989, 92B: 45 – 49.
- [10] 成永旭, 堵南山, 赖伟. 中华绒螯蟹成熟卵巢的脂类及脂肪酸组成 [J]. 中国水产科学, 1999, 6 (1): 79 – 81.
- [11] 成永旭, 堵南山, 赖伟. 不同阶段中华绒螯蟹肝胰腺的脂类及脂肪酸组成 [J]. 动物学报, 1998, 44 (4): 420 – 429.
- [12] 成永旭, 堵南山, 赖伟. 中华绒螯蟹卵巢快速发育期脂类积累以及对抱卵的影响 [J]. 水产学报, 2000, 24 (2): 113 – 118.
- [13] 堵南山, 赖伟, 陈鹏程, 等. 中华绒螯蟹卵黄形成的研究 [J]. 动物学报, 1999, 45 (1): 88 – 92.
- [14] Chen L Q, Jiang H B, Zhou Z L, et al. Purification of vitellin from the ovary of Chinese mitten-handed crab (*Eriocheir sinensis*) and development of an anti-vitellin ELISA [J]. Comp Biochem Physiol, 2004, 138B: 305 – 311.
- [15] 艾春香, 陈立侨, 温小波, 等. 维生素 E、C 和 HUFA 交互作用对中华绒螯蟹生殖性能的影响 [J]. 水产学报, 2002, 26 (6): 533 – 541.
- [16] 薛鲁征, 堵南山, 赖伟. 中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 雌性生殖系统的组织学研究 [J]. 华东师范大学学报: 自然科学版, 1987, 3: 88 – 97.
- [17] Millamena O M, Quintio E. The effects of diets on reproductive performance of eyestalk ablated and intact mud crab *Scylla serrata* [J]. Aquaculture, 2000, 181: 81 – 90.
- [18] 江洪波. 中华绒螯蟹蛋白质营养生理研究 [D]. 上海: 华东师范大学, 2003, 6: 32 – 37.
- [19] Lee F Y, Chang C F. The concentrations of vitellogenin (vitellin) and protein in hemolymph, ovary and hepatopancreas in different ovarian stages of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* [J]. Comp Biochem Physiol, 1997, 117A (4): 433 – 439.
- [20] 陈细华. 鲫鱼杂交一代卵黄发生机理的研究 [J]. 淡水渔业, 1993, 23 (3): 17 – 18.
- [21] Harrison K E. The role of nutrition in maturation, reproduction and embryonic development of decapod crustaceans: a review [J]. Shellfish Res, 1990, 9 (9): 1 – 28.
- [22] 李思发, 蔡完其, 邹曙明, 等. 阳澄湖中华绒螯蟹品质分析 [J]. 中国水产科学, 2000, 7 (3): 71 – 74.
- [23] Cahu C, Guillaume J, Stephan G, et al. Influence of phospholipid and highly unsaturated fatty acids on spawning rate and egg and tissue composition in *Penaeus vannamei* fed semi purified diets [J]. Aquaculture, 1994, 126: 159 – 170.
- [24] Djunaidah I S, Wille M, Kontara E K, et al. Reproductive performance and offspring quality in mud crab (*Scylla paramamosain*) broodstock fed different diets [J]. Aquat Internat, 2003, 11: 3 – 15.
- [25] Marsden G E, Guren J J, Hansford S W, et al. A moist artificial diet for prawn broodstock: Its effect on the variable reproductive performance of wild caught *Penaeus monodon* [J]. Aquaculture, 1997, 149: 145 – 156.
- [26] Wen X B, Chen L Q, Ai C X, et al. Essential fatty acid requirement of the Chinese Mitten crab [J]. Am Fish Soc Symp, 2003, 38: 257 – 264.
- [27] Alava V R, Kanazawa A, Teshima S I, et al. Effect of dietary

- phospholipids and n-3 highly unsaturated fatty acids on ovarian development of Kuruma prawn [J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1993, 59: 345–351.
- [28] Vazquez-Boucard C V, Levy P, Cecealdi H J, et al. Developmental changes in concentrations of vitellin, vitellogenin, and lipids in hemolymph, hepatopancreas, and ovaries from different ovarian stages of Indian white prawn *Penaeus indicus* [J]. *Exp Mar Biol Ecol*, 2002, 281: 63–75.
- [29] Spaargarden H D, Haefer P A. Interaction of ovary and hepatopancreas during the reproductive cycle of *Crangon crangon* II. Biochemical relationships [J]. *Crust Biol*, 1994, 14 (1): 6–19.

Effects of dietary lipid sources on ovary development and reproduction performance of female *Eriocheir sinensis*

LIU Li-he^{1,2}, CHEN Li-qiao¹, LI Kang¹, ZHOU Yong-kui¹, LI Er-chao¹

(1. Life Science College, East China Normal University, Shanghai 200062, China; 2. Hubei Center of Feed Technology, Wuhan 430023, China)

Abstract: Experiments were carried out to investigate the effects of dietary lipid sources on ovary development and reproduction performance of female broodstocks of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. Four experimental diets containing 6% different lipid sources (fish oil, peanut oil, pork lard and lecithin, respectively) were formulated and fed to the experimental crabs. Crabs fed with fresh frozen-fish served as the control. There were 15 crabs in each experimental tank and four replicates in each treatment. The feeding trial lasted 28 weeks. The results showed that broodstock crabs fed the diet containing pork lard and peanut oil had poor fecundity and low hatchability. Fecundity and hatchability of female crab fed diet with 6% pork lard were only respectively 56.9% and 32.57% of those with diet with 6% fish oil. Broodstock fed the diets containing fish oil showed the highest fecundity which was 2.787×10^3 cell/g. However, egg hatchability showed no significant differences compared with those with diet containing 6% lecithin and control. During ovary maturation, Vg could be determined in hemolymph during ovarian maturation of *E. sinensis*. Hepatopancreas somatic index (HSI) continuously decreased, while Gonad somatic index (GSI) increased in control group, especially during developmental stages III₁ – III₂. In contrast to control group, the trend of nutrients transferring from hepatopancreas and stored to ovary in the group fed with experimental diets lagged with most sharp peak appeared in stages III₂ – IV, which is more evident in groups fed diet containing pork lard and peanut oil, especially the former which made Vg content increase in hemolymph so as to get nutrients sufficient storage in ovary at stage III₁. However, at ovarian mature stage IV GSI of female crab was 11.50 for lecithin, 11.25 for fish oil, 8.85 for peanut oil and 7.30 for pork lard. Vg were affected by dietary lipid sources. Vg content in hemolymph of crab fed with diet containing 6% pork lard was significantly increased at the early ovarian maturation. During ovarian maturation IV, Vg in hemolymph of all groups except 6% lecithin group were significantly lower than those during stage III₂. Moreover, Vg of crab fed pork lard and frozen-fresh fish were significantly lower than that fed other lipid sources at ovarian mature stage IV. The results in present study indicated that *E. sinensis* transferred the nutrient in Hepatopancreas to ovary, and nutrients accumulated in ovary during phases III₁ – III₂. Dietary lipid sources could affect the ovary development and production performance by affecting the synthesis and accumulation of nutrients, such as vitellogenin, in the ovary. Besides, as a dietary lipid source, lecithin showed significantly good function in improve ovary development and production performance of *E. sinensis*. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14 (5): 786–793]

Key words: *Eriocheir sinensis*; lipid source; reproduction performance; vitellogenin; ovarian maturation

Corresponding author: CHEN Li-qiao. E-mail: lqchen@bio.ecnu.