

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2013.00381

饲料中大豆磷脂对红螯光壳螯虾性腺发育期营养物质积累的影响

王兰梅¹, 李嘉尧¹, 王丹丽^{1,2}, 吕巍巍¹, 孙婷¹, 左迪¹, 赵云龙¹

1. 华东师范大学 生命科学学院, 上海 200062;

2. 宁波大学 生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211

摘要: 基础饲料中添加 5 种不同水平的大豆磷脂 (SL): 0% (Diet 1), 1% (Diet 2), 2% (Diet 3), 4% (Diet 4) 和 6% (Diet 5)。饲喂初始体质量为 (25.64 ± 1.53) g 的红螯光壳螯虾(*Cherax quadricarinatus*) 雌虾 8 周, 观察其卵巢发育期个体生长、性腺指数等参数的变化, 分析卵巢和肝胰腺营养物质积累的快慢以及与营养物质积累相关基因脂肪酸结合蛋白(FABP) mRNA 表达的差异。结果表明: 饲料中不同水平的 SL 对卵巢发育期红螯光壳螯虾的成活率和相对增重率(WG)影响不显著($P>0.05$), 但饲喂 $\geq 2\%$ (SL) 饲料的雌虾性腺指数(GSI)显著升高($P<0.05$), 雌虾的肝胰腺指数(HSI)则随饲料中 SL 的增加而呈下降趋势($P>0.05$); 随着饲料中 SL 的增加, 虾肝胰腺中脂滴的体积增大, 数量增多, 结构更加完整, 质地更加均匀, 卵巢中脂滴和卵黄颗粒的数量增多, 体积增大; 同时, 饲料中 SL 的增加促进了 FABP 在肝胰腺和卵巢中的表达量。综上所述, 饲料中的 SL 对红螯光壳螯虾雌虾卵巢发育具有促进作用, 在培育红螯光壳螯虾雌虾亲体过程中, 含 6.5% 鱼油的基础饲料至少补充 2% 的 SL 有利于雌虾卵巢的快速发育。本研究旨在为深入研究虾蟹生殖生理学和规模化红螯光壳螯虾早繁苗种生产等提供基础资料。

关键词: 红螯光壳螯虾; 大豆磷脂; 卵巢发育; 脂肪酸结合蛋白; 超微结构

中图分类号: S963

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2013)02-0381-11

红螯光壳螯虾 (*Cherax quadricarinatus*) 具有个体大、适温范围广、水质要求低以及市场价格高等优点, 在世界范围内广泛养殖。目前对其营养需求的研究主要集中在蛋白质、能量、脂肪、胆固醇和磷脂上, 对于维生素、矿物质、必需氨基酸和脂肪酸等的需求还未见报道。已报道的红螯光壳螯虾幼虾对粗蛋白质的需求量在 30% ~ 35%^[1-4], 成虾的需求量为 25.6%, 氮能比为 11.4 mg · kJ⁻¹^[5], 亲虾的需求量则在 32% ~ 33%^[6-7]; 对粗脂肪的需求量幼虾在 4% ~ 7.5% (可消化脂肪)^[3,8], 亲虾为 8.7%^[7]; 幼虾对胆固醇的需求在 0 ~ 0.5%^[9-10], 亲虾为 0.55% ~ 0.75%^[11]; 对红螯光壳螯虾幼虾磷脂需求量的研究发现, 以 5% 鱼肝油和 1% 的玉米油为脂肪源时, 饲料中不需要

额外添加磷脂^[12], 而亲虾对磷脂的需求量还未见报道。甲壳动物亲体的营养状况直接影响其卵子发育和质量、胚胎发育以及幼虾的存活^[13-14] 等, 研究饲料营养素对甲壳动物亲体性腺发育的影响意义重大。

磷脂是细胞膜结构的重要组分, 是甲壳动物饲料的必需营养成分, 在卵巢发育过程中, 对脂类物质从肝胰腺经血淋巴转运到卵巢起着重要作用^[15-16]。然而甲壳动物自身合成磷脂的能力十分有限^[17], 必须从饲料中摄取。研究表明, 饲料中的磷脂对斑节对虾(*Penaeus monodon*)^[18]、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)^[19] 和中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)^[15,20] 等甲壳动物的卵巢发育和繁殖性能都有积极作用。而迄今为止, 有关饲

收稿日期: 2012-05-07; 修订日期: 2012-06-21.

基金项目: 上海市教育委员会科研创新项目(11CXY18); 公益性行业(农业)科研专项经费项目(200903056).

作者简介: 王兰梅(1983-), 女, 在读博士研究生, 主要从事水产动物营养与发育研究. E-mail: wanglanmei3160@yahoo.com.cn

通信作者: 赵云龙, 教授, 博士生导师. E-mail: ylzhaol@bio.ecnu.edu.cn

料中磷脂对红螯光壳螯虾亲体性腺发育的影响研究很少^[21]。

脂肪酸结合蛋白(fatty acid-binding proteins FABPs)是一类小分子量(14~15 kD)的胞质蛋白,以非共价形式连接疏水基团的脂肪酸,主要参与脂肪酸的吸收和利用;作为特定细胞器内脂肪酸的靶器官参与代谢途径;同时在脂肪酸的去垢剂效应中保护细胞结构的完整性^[22-23]。目前大多数研究都集中在脊椎动物 FABPs 的分类、结构和功能上,甲壳类 FABPs 的研究非常有限。虾蟹类上仅在凡纳滨对虾^[24]、中华绒螯蟹^[25-26]、红螯光壳螯虾^[27]、通讯螯虾(*Pacifastacus leniusculus*)和斑节对虾^[28]中有零星的研究报道。

本实验通过对红螯光壳螯虾雌虾性腺指数、肝胰腺和卵巢中脂滴及卵黄颗粒的观察,结合与脂肪酸吸收、利用和转运相关的基因 FABPmRNA 的表达,研究了饲料中的磷脂水平对红螯光壳螯虾雌体性腺发育的影响,以期为深入研究虾蟹生殖生理学和规模化红螯光壳螯虾早繁苗种生产等提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 试验饲料

试验设计了 5 个大豆磷脂(SL)水平的等氮(367 g·kg⁻¹)实用饲料,添加量分别为 Diet 1 (0% SL), Diet 2 (1% SL), Diet 3 (2% SL), Diet 4 (4% SL) 和 Diet 5 (6% SL)。以白鱼粉(美国海鲜有限公司,美国,西雅图)、豆粕(COFCO 中粮东海粮油有限公司,秦皇岛)为蛋白源,精炼鱼油为脂肪来源。试验基础饲料依据红螯光壳螯虾营养需求配制^[6-7]。各种饲料原料全部过 80 目筛,称重,混合,用双螺杆膨化机(EXT50A)挤压成直径为 3.0 mm 的膨化沉性颗粒饲料,晾干,置-20℃冰箱备用。各试验饲料组成及营养水平见表 1,各试验饲料的脂肪酸组成(%,占总脂肪酸)见表 2。

1.2 试验动物及饲养管理

试验在上海市金山区漕泾特种水产养殖场进行。将 500 只由当年幼苗养成的红螯光壳螯虾雌性成虾,在室内养殖箱内(长×宽×高=1 m×0.5 m×

0.5 m)用 Diet 1 驯养 1 周,待其适应后挑选个体均匀、健康的虾正式开始实验。虾初始体质量(IW)(25.64±1.53) g,每个养殖箱放养 8 只,4 个重复,实验为期 8 周,养殖水源为曝气后的自来水。

试验开始前,随机取 20 只虾称重,然后解剖取其卵巢称重,计算所得平均性腺指数 GSI(性腺指数=100×性腺重/虾体质量)为 0.20±0.02,表明虾此时正处于卵巢发育的初始阶段^[6]。养殖箱的底部放置瓦片以及 PVC 管(直径 5 cm,长度 20 cm)作为遮蔽物。每天分别在 8:00 和 18:00 投喂两次,日投喂量为虾体质量的 1%~3%,每次投喂前将粪便和残饵吸出。每两天换水 20%左右。试验期间水温控制在(28±1)℃,pH 值范围为 6.5~7.5,溶解氧大于 6 mg·L⁻¹,光照周期为 10D:14L。

1.3 生长和性腺发育指标

试验结束后,每只虾被称重后解剖,取出其肝胰腺和卵巢,称重后置于-80℃冰箱待用。成活率,相对增重率(WG),性腺指数(GSI)和肝胰腺指数(HSI)分别用以下公式计算:成活率=(试验结束时虾数量/试验开始时虾数量)×100%;相对增重率=(末体质量 FW -初体质量+死虾质量)/初体质量×100%;肝胰腺指数=肝胰腺重/末体质量×100%。

1.4 生化分析

饲料的水分、粗蛋白质、粗脂肪、粗灰分和总能分别采用 105℃常压干燥法、凯氏定氮法、酸水解全脂肪测定法、550℃灼烧法和氧氮仪法测定,每个样品至少 2 个重复。

饲料中脂肪酸的测定:脂肪样品的甲酯化根据 ISO 方法(ISO550, 2000)完成,之后将甲酯化的脂肪酸样品于 Hewlett-Packard HP-6890 气相色谱仪上测定(离子火焰 FID 检测器)(帕罗奥图,美国)。色谱柱为 HP-5.5% 苯甲基硅树脂毛细管柱(L=30 m, ID=0.25 mm, DF=0.20 μm),以氮气作为载气。进样口和检测器温度分别为 280℃和 300℃。柱温自 150℃ 升至 280℃ (4℃·min⁻¹),保持 10 min。脂肪酸标准品由 Supelco(贝尔丰特,美国)公司提供。每种脂肪酸的测定在相同色谱条件下,依据标准脂肪酸的保留时间来确定,每个样

表 1 试验饲料配方及营养成分表
Tab. 1 Ingredients and proximate composition of experimental diets

组成 ingredients	g·kg ⁻¹ ; 风干基础 air-dry basis				
	Diet 1	Diet 2	Diet 3	Diet 4	Diet 5
白鱼粉 white fish meal	320	320	320	320	320
豆粕 soybean meal	230	230	230	230	230
糊精 ^a dextrin ^a	30	30	30	30	30
鱼油 fish oil	65	65	65	65	65
面粉 wheat flour	255	255	255	255	255
维生素和矿物质预混料 ^b vitamin and mineral premix ^b	10	10	10	10	10
甜菜碱 l-cytine	5	5	5	5	5
氯化胆碱 70% choline chloride	5	5	5	5	5
磷酸二氢钙 ^c CaH ₂ (PO ₄) ₂ ^c	10	10	10	10	10
胆固醇 ^c cholesterol ^c	5	5	5	5	5
大豆磷脂 ^d soybean lecithin ^d	0	10	20	40	60
微晶纤维素 α-Cellulose	65	55	45	25	5
营养成分分析 analyzed nutrient compositions					
水分 moisture	76.7	78.6	78.5	80.2	88.1
灰分 ash	98.2	98.3	99.4	99.2	101.6
粗蛋白 crude protein	372.6	367	370.4	367.3	370.8
粗脂肪 crude lipid	95	104	114	121	132
总能 gross energy(MJ·kg ⁻¹)	18.71	18.89	19.18	19.39	19.59

注: ^a 糊精, 由北京双旋微生物培养基制品厂提供. ^b 维生素和矿物质预混料 (1 kg 饲料): V_A12 000 IU; V_D3 4 000 KIU; V_E60 mg; V_K3 15 mg; V_B1 15 mg; V_B2 8 mg; V_B6 20 mg; 氰钴胺 0.03 mg; 泛酸钙 40mg; 叶酸 1 mg; 烟酸 60 mg; 生物素 0.1 mg; V_C 70 mg; 肌醇 100 mg; Mg 100~200 mg; I 0.65 mg; Se 0.4~1 mg; Co 0.15 mg; Fe 300 mg; Cu 20~25 mg; Mn 30 mg; Zn 30~120 mg. 用沸石粉填充到 1 kg. ^c 胆固醇, CaH₂(PO₄)₂ 由上海化学试剂公司提供. ^d 大豆磷脂 (总磷脂含量>95%): 丙酮不溶物≥95%, 由北京美亚斯磷脂技术有限公司提供. 其他原料由上海红马饲料有限公司提供.

Note: ^a Dextrin, supplied by Beijing Shuangxuan Microbe Culture Medium Products Factory. ^b Vitamin and mineral premix (in 1 kg diet): vitamin A 12 000 IU; vitamin D₃ 4 000 KIU; vitamin E 60 mg; vitamin K₃ 15 mg; thiamin 15 mg; riboflavin 8 mg; pyridoxine 20 mg; cyanocobalamine 0.03 mg; calcium panthothenic 40 mg; folic acid 1 mg; niacin 60 mg; biotin 0.1 mg; vitamin C 70 mg; inositol 100 mg; Mg 100~200 mg; I 0.65 mg; Se 0.4~1 mg; Co 0.15 mg; Fe 300 mg; Cu 20~25 mg; Mn 30 mg; Zn 30~120 mg. All ingredients were diluted with zeolite to 1 kg. ^c Cholesterol, CaH₂(PO₄)₂ supplied by Shanghai Chemical Reagent Company, Shanghai, China. ^d Soybean lecithin (lecithin content >95%): acetone insoluble ≥95%, supplied by Merya's Lecithin Co., Ltd., Beijing, China. Other ingredients were supplied by Shanghai Hongma Inc, China.

品至少 2 个重复。数据以每种脂肪酸占总脂肪酸的百分比表示。

1.5 电镜样品制备及观察

试验结束后, 每个养殖缸随机取 3 只虾解剖取其肝胰腺和卵巢, 经 2.5 %戊二醛和 1%锇酸双固定, 4℃冰箱中保存, 酒精脱水, 环氧树脂 Epon812 包埋, LKB 超薄机超薄切片, 醋酸双氧铀一柠檬酸铅双染法染色, 日立 H-7650 型透射电镜观察并拍照。

1.6 FABP mRNA 表达分析

红螯光壳螯虾肝胰腺和卵巢的总 RNA 提取,

根据原平皓(天津)生物技术有限公司的组织 RNA 快速提取试剂盒(DR104)的操作步骤完成, 分别用核酸蛋白检测仪(OD₂₆₀:OD₂₈₀)(埃彭多夫 Eppendorf, 德国)和琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的浓度和质量。然后用 PrimeScript™ Real-time PCR 试剂盒(TaKaRa, 大连)将 500 ng 的总 RNA 反转录成 cDNA 模板。

实时荧光定量 PCR 用 CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad, 美国)完成, FABP 和 18S-rRNA 基因的实时荧光定量 PCR 引物(表 3)根据已知的红螯光壳螯虾 cDNA 序列设计完成(GenBank 序列

表 2 试验饲料脂肪酸组成
Tab. 2 Fatty acid compositions of the experimental diets
%, 占总脂肪酸比 total fatty acids

脂肪酸 fatty acid	Diet 1	Diet 2	Diet 3	Diet 4	Diet 5
C _{12:0}			0.04	0.039	0.038
C _{14:0}	4.65	4.43	4.37	3.98	3.65
C _{15:0}	0.38	0.36	0.34	0.32	0.31
C _{16:0}	18.74	18.71	18.60	18.87	19.29
C _{17:0}	1.25	1.19	1.09	0.99	0.89
C _{18:0}	3.64	3.62	3.51	3.54	3.54
C _{21:0}	1.67	1.60	1.50	1.36	1.22
C _{22:0}			0.10	0.17	0.20
C _{23:0}	0.75	0.72	0.65	0.61	0.56
C _{24:0}			0.09	0.10	0.10
ΣSFA	31.08	30.64	30.27	29.97	29.77
C _{16:1}	6.43	6.15	5.97	5.41	5.12
C _{17:1}	0.95	0.91	1.02	0.80	0.79
C _{18:1n9}	15.91	15.67	15.05	14.73	14.76
C _{20:1n9}	4.72	4.44	5.56	5.08	4.42
C _{24:1n9}	1.00	0.91	0.81	0.73	0.62
ΣMUFA	29.00	28.08	28.40	26.75	25.70
C _{18:2n6}	8.29	9.53	11.92	16.14	19.05
C _{18:3n6}			0.14	0.12	0.11
C _{20:3n6}	0.52	0.57	0.94	0.95	0.75
C _{20:4n6}	3.55	3.28	2.19	1.86	1.71
Σn-6	12.36	13.38	15.18	19.07	21.62
C _{18:3n3}	0.97	1.23	1.44	1.79	2.24
C _{20:3n3}	0.07				
C _{20:5n3}	13.74	13.85	12.71	11.56	10.67
C _{22:5n3}	2.65	2.55	2.36	2.13	1.98
C _{22:6n3}	10.15	10.28	9.62	8.70	8.05
Σn-3	27.58	27.91	26.11	24.17	22.94
PUFA	39.94	41.29	41.29	43.25	44.56
HUFA	30.09	29.96	26.86	24.25	22.41

注: SFA - 饱和脂肪酸; MUFA - 单不饱和脂肪酸; PUFA - 多不饱和脂肪酸; HUFA - 高不饱和脂肪酸, 指 C_{20:3n} 以上的 PUFA.
Note: SFA - saturated fatty acid; MUFA - monounsaturated fatty acid; PUFA - polyunsaturated fatty acid; HUFA - highly unsaturated fatty acid, meaning the PUFA more than C_{20:3n}.

号分别为: JQ991604 和 AF235966)。试验结束后, 每个养殖缸随机取 3 只虾解剖取其肝胰腺和卵巢, 分别混合为一个样本。检测时, 以 18S rRNA 为内参, 每个样本 3 个重复。反应体系为 20 μL: 1.0 μL cDNA 模板, 10.0 μL YStart SYBR Green qPCR SuperMix(原平皓生物技术有限公司, 天津), 8.0 μL ddH₂O 和上下游引物各 0.5 μL。反应条件为: 95℃ 2 min, 紧接着 95℃ 15 s, 60℃ 30 s 共 40 个循环。试验结果用 CFX ManagerTM 软件(1.0 版本)进行分析, 以 Diet 1 组的表达量为 1, 用 2^{-ΔΔCt} 方法运算得到表达量的比值, 以 18S rRNA 作为参照校准结果。

1.7 数据统计与分析

试验结果用平均值±标准误($\bar{x} \pm SE$)表示。应用 STATISTICA 8.0 (Statsoft., 塔尔萨, 美国)软件包对数据进行单因子方差分析(One-way ANOVA), 并对差异显著者进行 Duncan 氏多重比较, 显著水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 红螯光壳螯虾的生长和性腺发育

由表 4 可知, 试验结束后, 各饲料组红螯光壳螯虾的成活率和 WG 无显著差异。随着饲料中 SL 的增加, 红螯光壳螯虾的 HSI 下降(从 7.09 下降到 6.18), 但差异不显著($P > 0.05$)。饲喂 ≥ 2% SL 饲料的虾比 Diet 1 和 Diet 2 组的虾具有显著高的 GSI ($P < 0.05$)。

2.2 红螯光壳螯虾肝胰腺和卵巢的超微结构

Diet 1 组虾肝胰腺中的脂滴正处于形成阶段, 由胞饮小泡复合体将胞质中的脂类物质包入其中, 外围的粗面内质网及溶酶体通过合成物质和自身融入形成脂滴, 此时正在形成的脂滴大小不一, 内部质地不均匀, 胞饮小泡复合体还有许多空隙

表 3 实时荧光定量 PCR 引物
Tab. 3 Primers used in the real-time quantitative RT-PCR analyses

引物 primers	序列 sequences
FABP 5'引物 FABP 5' primer	5'-TCAAGACAGTGAGGCAAAGG-3'
FABP 3'引物 FABP 3' primer	5'-GCATCTACAAGCGCCAGTAA-3'
18S rRNA 5'引物 18S rRNA 5' primer	5'-CATGCCCGTTCTTAGTTGGT-3'
18S rRNA 3'引物 18S rRNA 3' primer	5'-GTGCGGCCCGAGAAATATAAA-3'

表 4 各饲料组对红螯光壳螯虾雌体生长指标, 肝胰腺指数(HSI)和性腺指数(GSI)的影响
Tab. 4 Growth performance, hepatosomatic index (HSI) and gonadosomatic index (GSI) of female *Cherax quadricarinatus* fed experimental diets

$\bar{x} \pm SE; n = 4$

项目 item	Diet 1	Diet 2	Diet3	Diet 4	Diet 5
初体质量/g initial body weight	25.64±0.03	25.64±0.03	25.66±0.03	25.64±0.04	25.61±0.02
末体质量/g final body weight	48.69±3.77	48.89±2.59	46.07±2.77	48.65±1.06	46.53±1.93
相对增重率/% weight gain	84.47±12.27	86.81±11.12	78.46±10.87	93.17±6.42	79.97±7.18
成活率/% survival	78.13±3.13	81.25±8.07	87.50±5.10	81.25±8.07	84.38±3.13
肝胰腺指数 HIS	7.09±0.53	6.88±0.35	6.36±0.18	6.22±0.58	6.18±0.58
性腺指数 GSI	1.43±0.14a	1.50±0.03a	2.17±0.31b	2.19±0.28b	2.22±0.05b

注: 同行标注不同字母表示差异显著($P<0.05$).
Note: Means with different superscripts are significantly different ($P<0.05$).

(图版 I-1)。Diet 2 组虾肝胰腺中的脂滴已基本成行, 体积较 Diet 1 组大, 数量增多, 大小相对均匀(图版 I-2)。Diet 3 组相较于 Diet 1 和 Diet 2 组脂滴的体积增大, 排列紧密, 结构基本完整, 内部质地更加均匀(图版 I-3), 同时发现了卵黄蛋白原颗粒的形成(图版 I-4)。Diet 4 组虾肝胰腺中的脂滴体积变的更大(图版 I-5)。至 Diet 5 组时, 肝胰腺中已大量充斥着成形的脂滴, 其排列紧密, 结构完整, 内部质地均匀, 此时已基本看不到其他的细胞器(图版 I-6)。

对卵巢的电镜观察发现, Diet 1 组卵巢中的脂滴数量少, 卵黄颗粒体积小, 大小不一, 分布不紧致(图版 II-1), Diet 2 组相较于 Diet 1 组, 放大倍数减小, 但观察到有些卵黄颗粒的体积反而更大(图版 II-2, 3), 同时在卵黄颗粒周围可见明显的脂滴(图版 II-3)。Diet 3 组观察到的卵黄颗粒的数量增多, 排列相对紧致, 而脂滴的形状变得不规则, 可能被卵黄颗粒挤压的结果(图版 II-4, 5)。Diet 4 组卵黄颗粒的体积继续增大, 数量增多, 此时卵黄颗粒和脂滴排列紧致的遍布于卵巢中(图版 II-6, 7)。到 Diet 5 组时, 卵黄颗粒体积明显增大, 在放大 8 000 和 12 000 倍的视野下, 仅能观察到卵黄颗粒的一小部分(图版 II-8, 9)。

2.3 红螯光壳螯虾肝胰腺和卵巢 FABP mRNA 的表达

由图 1 和图 2 可知, 随着饲料中大豆磷脂含量的增加, 肝胰腺和卵巢 FABPmRNA 的表达量增加。Diet 2 组肝胰腺和卵巢 FABP 的表达量相对于

Diet 1 组有增加的趋势, 但差异不显著($P>0.05$)。

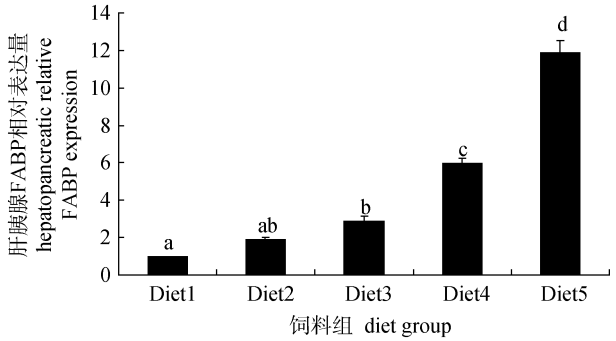


图 1 各饲料组对红螯光壳螯虾雌体肝胰腺 FABP 相对表达量的影响
柱上不同字母表示组间差异具统计学意义($P<0.05$).
Fig. 1 Hepatopancreatic relative FABP expressions of female *Cherax quadricarinatus* fed experimental diets
Values with different letter means significant difference between groups ($P<0.05$).

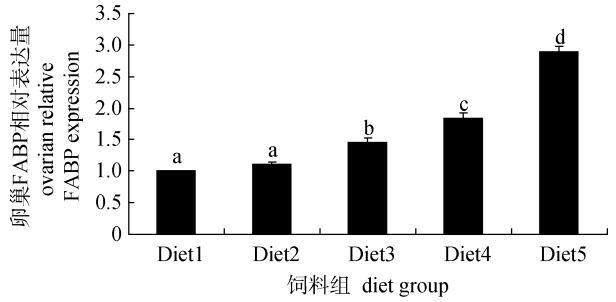


图 2 各饲料组对红螯光壳螯虾雌体卵巢 FABP 相对表达量的影响
柱上不同字母表示组间差异具统计学意义($P<0.05$).
Fig. 2 Ovarian relative FABP expressions of female *Cherax quadricarinatus* fed experimental diets
Values with different letter means significant difference between groups ($P<0.05$).

3 讨论

3.1 饲料中大豆磷脂对红螯光壳螯虾生长和性腺发育的影响

研究表明,饲料中适宜的磷脂能提高甲壳动物仔稚幼体的存活和生长率^[16-17, 29-30]。在本研究中,各组间的红螯光壳螯虾的存活率和相对增重率差异不显著($P>0.05$), GSI 可作为衡量红螯光壳螯虾性腺发育状况优劣的可靠指标^[6],当饲料中 SL 添加量 $\geq 2\%$ 时,虾的 GSI 显著升高($P<0.05$)。这与饲料中高水平的 SL 提高了日本对虾(*Marsupenaeus japonicus*)^[31]和中华绒螯蟹^[15]的 GSI 的研究结果一致。本试验结果表明,饲料中添加 6.5% 的鱼油可能已经满足了红螯光壳螯虾成体存活和生长的需要,而 SL 的增加则更多地被用于其卵巢发育。

同时,虾蟹在性腺发育阶段,其 HSI 和 GSI 呈反相关^[6, 32-33],表明存在肝胰腺中营养物质向卵巢持续转运的过程。在本试验中,随着虾体 GSI 的增加,HSI 表现出的降低趋势也证实了这一观点。此外相似的结果在凡纳滨对虾^[34]、罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)^[35]和中华绒螯蟹^[15]中也有报道。

3.2 饲料中大豆磷脂对红螯光壳螯虾肝胰腺和卵巢超微结构的影响

肝胰腺是十足类甲壳动物消化系统的重要组成部分,具有合成与分泌消化酶、吸收及储存营养物质的功能,在卵黄发生期对卵黄物质的积累有重要影响^[36-38]。本实验室已开展了红螯光壳螯虾卵黄发生期肝胰腺和卵巢显微与超微结构变化的研究^[36, 39],旨在通过对结构的了解,进一步探讨它与营养物质的吸收、代谢及相关生理功能间的联系。在此基础上,本试验发现饲料中不同水平的磷脂对红螯光壳螯虾肝胰腺和卵巢中营养物质的积累影响显著。随着饲料中 SL 的增加,红螯光壳螯虾肝胰腺中脂滴的体积增大,数量增多,结构更加完整,质地更加均匀。投喂以脂肪为主的饲料时,斑节对虾肝胰腺 R 细胞胞质中也有许多小型的电子半透明脂滴分散分布^[40]。对斑节对虾的

研究同时指出,脂肪是对虾体内贮存能量的重要形式,认为肝胰腺可作为饲料营养价值优劣的监测器官,而 R 细胞在超微结构上的变化能反映饲料营养价值的高低^[41]。投喂中华绒螯蟹脂质营养丰富的饲料时,其肝胰腺 R 细胞胞质中的脂肪滴数量也明显增多^[42]。

红螯光壳螯虾在卵黄发生中后期以外源性卵黄合成为主,外源性物质主要来自肝胰腺^[36]。本试验肝胰腺中观察到的大量脂滴和卵黄蛋白原颗粒,在卵黄发生阶段可能经血淋巴转运入卵巢,参与卵黄物质的合成与积累^[39]。同时随着饲料中 SL 的增加,卵巢中卵黄颗粒和脂滴的数量也增加,体积增大。可见,饲料中的 SL 有利于卵黄发生期红螯光壳螯虾卵巢中卵黄物质的积累。

3.3 饲料中大豆磷脂对红螯光壳螯虾肝胰腺和卵巢 FABP mRNA 表达的影响

本实验室研究发现, FABP 在红螯光壳螯虾肝胰腺中的表达量最高,其次是肠和卵巢^[27],而且 FABP 的表达与机体脂肪酸的吸收、代谢和转运水平密切相关,其表达情况直接反映了机体脂肪酸的运输速率,并在一定程度上反映了机体脂肪酸的合成与代谢水平^[21, 43]。可见,脂肪酸与 FABP 之间存在一种直接或间接的反馈调节机制^[25-26]。

在本试验过程中,红螯光壳螯虾正处于卵巢快速发育时期,需要积累大量的脂类物质为后期卵子的形成、胚胎发育以及幼虾的孵化做准备,而肝胰腺作为脂类物质的主要储存器官,可将脂类物质经由血淋巴转运到卵巢中^[6, 21, 32-33]。随着饲料中 SL 的增加,红螯光壳螯虾肝胰腺和卵巢中多不饱和脂肪酸(PUFA)的含量显著升高^[21],而 FABP 作为细胞内 PUFA 的运载体,对其进入细胞靶位点从而发挥正常生理功能起着非常重要的作用^[43]。因此,本试验中肝胰腺和卵巢中 FABP 的表达量随饲料中 SL 的增加而显著升高的结果暗示:在红螯光壳螯虾卵巢快速发育期,饲料中的 SL 可能促进了脂类物质在肝胰腺和卵巢中的积累以及从肝胰腺向卵巢的转运。对中华绒螯蟹 FABP 的研究也证实了 FABP 在性腺快速发育阶

段的脂类转运过程中的作用, 并间接证实了肝胰腺、血淋巴、卵巢和精巢在脂类物质转运与利用上的相互作用^[25]。对于脂肪酸与 FABP 之间具体的调节机制, 有学者认为脂肪酸可能通过调节 FABP 的方式参与到信号调控中去, 但如何参与调控还需要进一步研究^[27]。同时, 饲料中不同的 SL 添加量造成的虾 GSI 的不同可能是 FABP 表达量变化的直接原因, 正如中华绒螯蟹 FABP 的表达量随不同的性腺发育阶段变化一样^[25]。根据本试验研究结果, 建议在培育红螯光壳螯虾亲体的养殖生产中, 在含 6.5% 鱼油的基础饲料中至少补充 2% 的 SL 有利于螯虾性腺的快速发育。

参考文献:

- [1] Cortés-Jacinto E, Villarreal-Colmenares H, Civera-Cerecedo R, et al. Effect of dietary protein level on growth and survival of juvenile fresh water crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae) [J]. Aquat Nutr, 2003, 9 (4): 207–213.
- [2] Thompson K R, Metts L S, Muzinic L A, et al. Effects of feeding practical diets containing different protein levels, with or without fish meal, on growth, survival, body composition and processing traits of male and female Australian red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) grown in ponds [J]. Aquat Nutr, 2006, 12 (3): 227–238.
- [3] Cortés-Jacinto E, Villarreal-Colmenares H, Cruz-Suarez L E, et al. Effect of different dietary protein and lipid levels on growth and survival of juvenile Australian redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (von Martens) [J]. Aquat Nutr, 2005, 11(4): 283–291.
- [4] Cortés-Jacinto E, Campa-Córdova A I, Ascencio F, et al. The effect of protein and energy levels in diet on the antioxidant activity of juvenile redclaw *Cherax quadricarinatus* (von Martens, 1868) [J]. Hidrobiológica, 2009, 19 (2): 77–83.
- [5] Cortés-Jacinto E, Villarreal-Colmenares H, Civera-Cerecedo R, et al. Effect of dietary protein level on the growth and survival of pre-adult freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens) in monosex culture [J]. Aquat Res, 2004, 35: 71–79.
- [6] Rodríguez-González H, García-Ulloa M, Hernández-Llamas A, et al. Effect of dietary protein level on spawning and egg quality of redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* [J]. Aquaculture, 2006, 257: 412–419.
- [7] Rodríguez-González H, Villarreal, H, García-Ulloa M, et al. Dietary lipid requirements for optimal egg quality of redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* [J]. World Aqu Soc, 2009, 40: 531–539.
- [8] Hernández-Vergara M P, Rouse D B, Olvera-Novoa M A, et al. Effects of dietary lipid level and source on growth and proximate composition of juvenile redclaw (*Cherax quadricarinatus*) reared under semi-intensive culture conditions [J]. Aquaculture, 2003, 223: 107–115.
- [9] Thompson K R, Muzinic L A, Christian T D, et al. Effect on growth, survival, and fatty acid composition of Australian red claw crayfish *Cherax quadricarinatus* fed practical diets with and without supplemental lecithin and/or cholesterol [J]. World Aqu Soc, 2003, 34 (1): 1–10.
- [10] Hernández P V, Olvera-Novoa M A, Rouse D B. Effect of dietary cholesterol on growth and survival of juvenile red-claw *Cherax quadricarinatus* under laboratory conditions [J]. Aquaculture, 2004, 236: 405–411.
- [11] Li J Y, Guo Z L, Gan X H, et al. Effect of different dietary lipid sources on growth and gonad maturation of pre-adult female *Cherax quadricarinatus* (von Martens) [J]. Aquat Nutr, 2011, 17: 853–860.
- [12] Thompson K R, Muzinic L A, Christian T D, et al. Lecithin requirements of juvenile Australian red claw crayfish *Cherax quadricarinatus* [J]. Aquat Nutr, 2003, 9: 223–230.
- [13] Lavens P, Sorgeloos P. Experiences on importance of diet for shrimp postlarval quality [J]. Aquaculture, 2000, 191: 169–176.
- [14] García-Guerrero M, Racotta I S, Villarreal H. Variation in lipid, protein, and carbohydrate content during the embryonic development of the crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae) [J]. J Crustacean Biol, 2003, 23(1): 1–6.
- [15] Sui L Y, Wu X G, Wille M, et al. Effect of dietary soybean lecithin on reproductive performance of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* (H. Milne-Edwards) Broodstock [J]. Aquat Int, 2009, 17(1): 45–56.
- [16] Gong H, Lawrence A L, Gatlin D M, et al. Comparison of different types and levels of commercial soybean lecithin supplemented in semi-purified diets for juvenile *Litopenaeus vannamei* Boone [J]. Aquat Nutr, 2001, 7(1): 11–17.
- [17] Kanazawa A, Teshima S, Sakamoto M. Effects of dietary lipids, fatty acids and phospholipids on the growth and survival of prawn (*Penaeus japonicus*) larvae [J]. Aquaculture,

- 1985, 50: 39–49.
- [18] Millamena O M, Primavera J H, Pudadera R A, et al. The effects of diets on the reproductive performance of pond-reared *Penaeus monodon* Fabricius broodstock [A]. Manila: Asian Fisheries Forum, 1986: 26–31.
- [19] Cahu C L, Guillaume J C, 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.
- [20] Wu X G, Cheng Y X, Sui L Y, et al. Effect of dietary supplementation of phospholipids and highly unsaturated fatty acids on reproductive performance and offspring quality of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* (H. Milne-Edwards), female broodstock [J]. Aquaculture, 2007, 273: 602–613.
- [21] Wang L M, Zuo D, Lv W W, et al. Effects of dietary soybean lecithin on gonadal development and vitellogenin mRNA expression in the female redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (von Martens) at first maturation [J]. Aquacult Res, 2012, 1–10. doi:10.1111/j.1365-2109.2012.03128.x.
- [22] Corsico B, Liou H L, Storch J. The alpha-helical domain of liver fatty acid binding protein is responsible for the diffusion-mediated transfer of fatty acids to phospholipid membranes [J]. Biochemistry, 2004, 43: 3600–3607.
- [23] Storch J, Veerkamp J H, Hsu K T. Similar mechanisms of fatty acid transfer from human and rodent fatty acid-binding proteins to membranes: liver, intestine, heart muscle and adipose tissue FABPs [J]. Mol Cell Biochem, 2002, 239: 25–33.
- [24] 赵永贞, 陈秀荔, 谢达祥, 等. 凡纳滨对虾脂肪酸结合蛋白基因全长 cDNA 的克隆及序列分析[J]. 水产学报, 2011, 34(11): 1681–1687.
- [25] Gong Y N, Li W W, Sun J L, et al. Molecular cloning and tissue expression of the fatty acid-binding protein (Es-FABP) gene in female Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) [J]. BMC Molecular Biology, 2010, 11: 71–82.
- [26] Li W W, Jin X K, He L, et al. Molecular cloning and tissue expression of the fatty acid-binding protein (Es-FABP9) gene in the reproduction seasons of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* [J]. Mol Biol Rep, 2011, 38: 5169–5177.
- [27] 李家尧. 红螯光壳螯虾亲虾脂类营养需求及脂肪酸结合蛋白的功能研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2011: 1–123.
- [28] Söderhäll I, Tangprasitipap A, Liu H P, et al. Characterization of a hemocyte intracellular fatty acid-binding protein from crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) and shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. FEBS J, 2006, 273(13): 2902–2912.
- [29] Chen H Y, Jenn J S. Combined effects of dietary phosphatidylcholine and cholesterol on the growth survival and body lipid composition of marine shrimp, *Penaeus penicillatus* [J]. Aquaculture, 1991, 96: 167–178.
- [30] Paibulkichakul C, Piyatiratitivorakul S, Kittakoop P, et al. Optimal dietary level of lecithin and cholesterol for black tiger prawn *Penaeus monodon* larvae and postlarvae [J]. Aquaculture, 1998, 176: 273–281.
- [31] Alava V R, Kanazawa A, Teshima S, et al. Effect of dietary phospholipids and n-3 highly unsaturated fatty acids on ovarian development of kuruma prawn [J]. Nippon Suisan Gakk, 1993, 59(2): 345–351.
- [32] Li J Y, Guo Z L, Gan X H, et al. Biochemical changes during vitellogenesis in the red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (von Martens) [J]. Aqu Res, 2010, 41: 446–455.
- [33] Rodríguez-González H, Villarreal H, García-Ulloa M, et al. Evaluation of practical diets containing different protein levels on gonad development of female redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* [J]. Aqu Nutr, 2009, 15: 347–355.
- [34] Palacios E, Ibarra A M, Racotta I S. Tissue biochemical composition in relation to multiple spawning in wild and pond-reared *Penaeus vannamei* broodstock [J]. Aquaculture, 2000, 185: 353–371.
- [35] Cavalli R O, Tamtin M, Lavens P, et al. Variations in lipid classes and fatty acid content in tissues of wild *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) females during maturation [J]. Aquaculture, 2001, 193: 311–324.
- [36] 李家尧. 红螯光壳螯虾(*Cherax quadricarinatus*)卵黄发生的研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2008: 1–79.
- [37] 吴嘉敏, 姜新耀. 中华绒螯蟹血淋巴和肝胰腺的总蛋白含量与性早熟的关系[J]. 水产学报, 2000, 24 (4): 306–311.
- [38] 成永旭, 李少菁, 王桂忠, 等. 锯缘青蟹卵黄发生期卵巢和肝胰腺脂类的变化[J]. 海洋学报, 2001, 23 (3): 66–77.
- [39] 李嘉尧, 赵云龙, 秦芬, 等. 红螯光壳螯虾卵黄发生的超微结构研究[J]. 复旦学报, 2007, 46(6): 987–991.
- [40] Storch V, Juario J V, Pascual F. Early effects of nutritional stress on the liver of milkfish, *Chanos chanos* (Forsskal), and on the tiger prawn, *Penaeus monodon* (Fabricius) [J]. Aquaculture, 1984, 136: 229–236.
- [41] Vogt G, Storch V, Quinito E T, et al. Midgut gland as monitor organ for the nutritional value of diet in *Penaeus monodon* [J]. Aquaculture, 1985, 48: 1–12.
- [42] 江洪波, 陈立侨, 周忠良, 等. 脂质营养对中华绒螯蟹幼

- 体肝胰腺超微结构的影响[J]. 动物学研究, 2001, 22(1): 64–68.
- [43] Liu R Z, Li X, Godbout R. A novel fatty acid-binding protein (FABP) gene resulting from tandem geneduplication in mammals: transcription in rat retina and testis [J]. Genomics, 2008, 92: 436–445.

Effects of dietary soybean lecithin on nutrient accumulation during gonadal development in the female *Cherax quadricarinatus*

WANG Lanmei¹, LI Jiayao¹, WANG Danli^{1,2}, LV Weiwei¹, SUN Ting¹, ZUO Di¹, ZHAO Yunlong¹

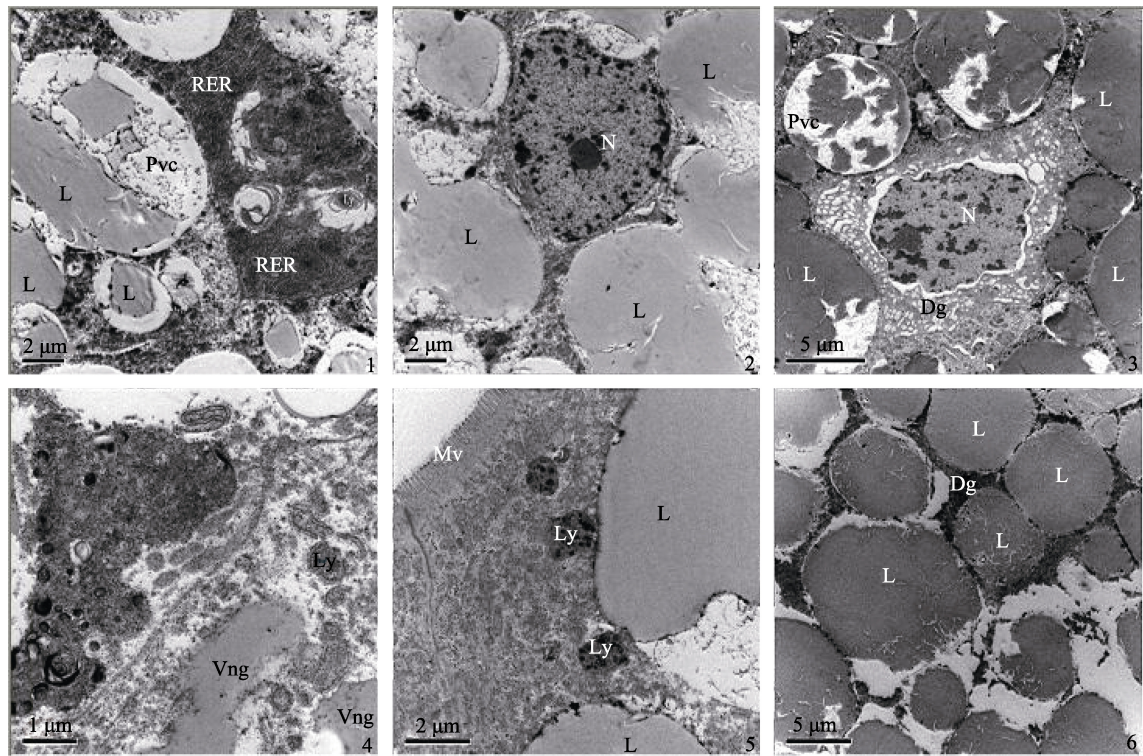
1. Life Science College, East China Normal University, Shanghai 200062, China;

2. College of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China.

Abstract: The effects of increasing levels of dietary soybean lecithin (SL) on growth, ovarian development, tissue ultrastructure and fatty acid-binding proteins (FABP) mRNA expression of female redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (initial body weight 25.64 g±1.53 g), was investigated over 8 weeks. Five treatments were applied as 0% (Diet 1), 1% (Diet 2), 2% (Diet 3), 4% (Diet 4), 6% (Diet 5). Survival and weight gain for each group were not significantly different ($P>0.05$). Redclaw crayfish fed diets containing $\geq 2\%$ SL had a significantly higher gonadosomatic index (GSI) than those fed with Diets 1 and 2 ($P<0.05$), and the hepatosomatic index (HSI) showed a decreasing trend with increasing levels of dietary SL ($P>0.05$). With increasing percentages of dietary SL, the hepatopancreatic lipid droplets increased in number and size and the structure and texture was more complete and evenly distributed. The ovarian lipid droplets and yolk granules also increased in number and size. Higher dietary SL yielded higher hepatopancreatic and ovarian FABP mRNA expression. Our results suggest that dietary SL has a positive effect on ovarian development in redclaw crayfish broodstock, and at least 2% SL should be supplemented in broodstock diets to enhance ovarian maturation during aquaculture.

Key words: *Cherax quadricarinatus*; soybean lecithin; ovarian development; FABP; tissue ultrastructure

Corresponding author: ZHAO Yunlong. E-mail: ylzhaobio.ecnu.edu.cn

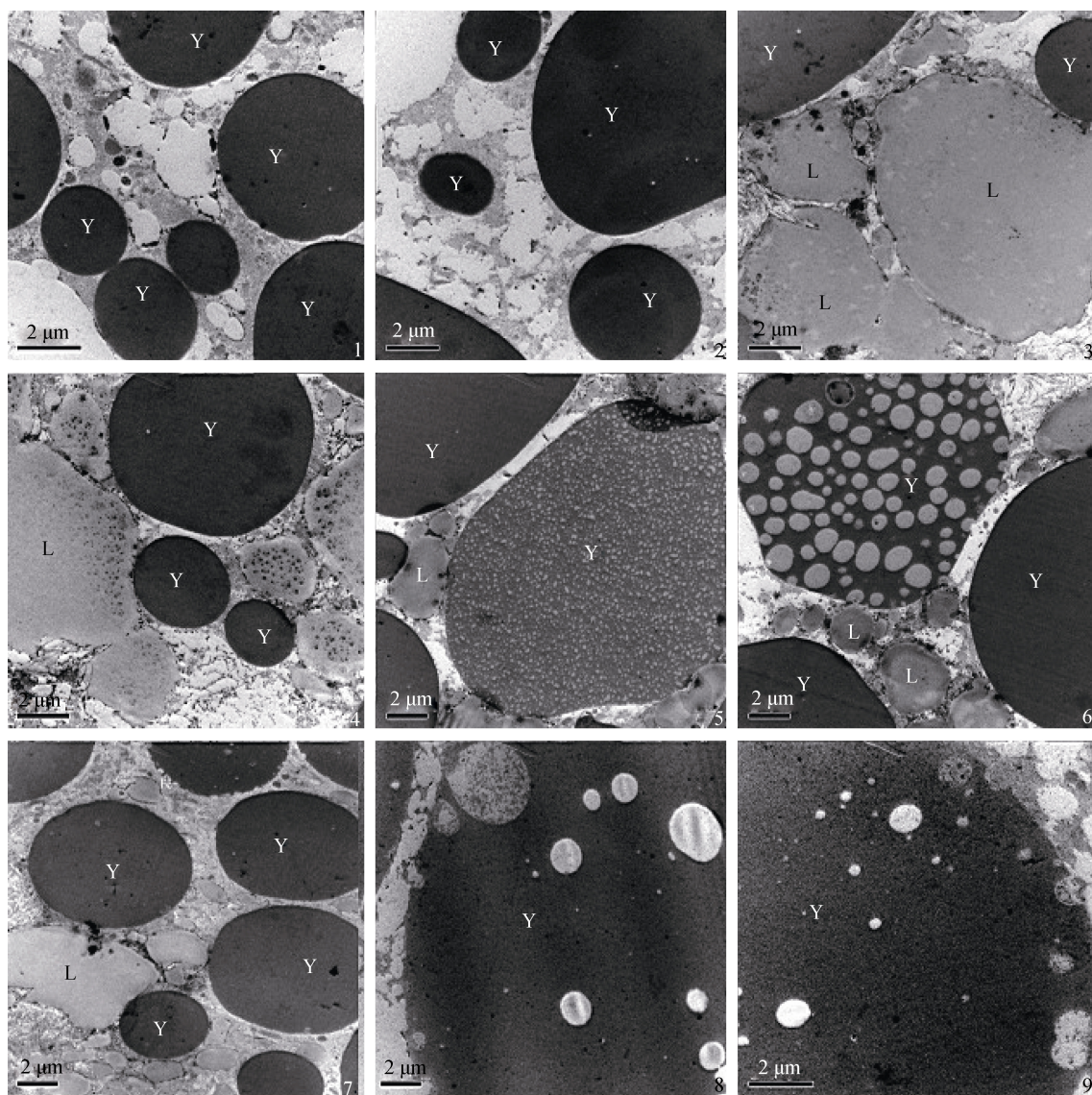


图版 I 各饲料组对红螯光壳蟹雌体肝胰腺超微结构的影响

1: Diet 1 组, $\times 8\,000$, 示脂滴的形成. 2: Diet 2 组, $\times 8\,000$, 示脂滴和细胞核. 3: Diet 3 组, $\times 6\,000$, 示脂滴的形成. 4: Diet 3 组, $\times 20\,000$, 示卵黄蛋白原的形成. 5: Diet 4 组, $\times 12\,000$, 示脂滴. 6: Diet 5 组, $\times 5\,000$, 示脂滴. Dg: 致密颗粒; L: 脂滴; Ly: 溶酶体; N: 细胞核; Pvc: 胞饮小泡复合体; RER: 粗面内质网; Vng: 卵黄蛋白原颗粒.

Plate I Ultrastructure of hepatopancreas for female *Cherax quadricarinatus* fed experimental diets

1: Diet 1 group, $\times 8\,000$, the formation of lipid droplets. 2: Diet 2 group, $\times 8\,000$, lipid droplets and nucleus. 3: Diet 3 group, $\times 6\,000$, the formation of lipid droplets. 4: Diet 3 group, $\times 20\,000$, the formation of vitellogenin particles. 5: Diet 4 group, $\times 12\,000$, lipid droplets. 6: Diet 5 group, $\times 5\,000$, lipid droplets. Dg: dense granules; L: Lipid droplets; Ly: Lysosome; N: Nucleus; Pvc: pinocytotic vesicles complex; RER: rough endoplasmic reticulum; Vng: vitellogenin particles.



图版 II 各饲料组对红螯光壳螯虾雌体卵巢超微结构的影响

1: Diet 1 组, $\times 12\ 000$, 示卵黄颗粒. 2: Diet 2 组, $\times 10\ 000$, 示卵黄颗粒. 3: Diet 2 组, $\times 10\ 000$, 示脂滴及卵黄颗粒. 4: Diet 3 组, $\times 10\ 000$, 示脂滴及卵黄颗粒. 5: Diet 3 组, $\times 8\ 000$, 示卵黄颗粒的形成及脂滴. 6: Diet 4 组, $\times 8\ 000$, 示卵黄颗粒. 7: Diet 4 组, $\times 8\ 000$, 示脂滴、卵黄颗粒及滤泡细胞. 8: Diet 5 组, $\times 8\ 000$, 卵黄颗粒. 9: Diet 5 组, $\times 12\ 000$, 示卵黄颗粒. Fc: 滤泡细胞; L: 脂滴; Y: 卵黄颗粒.

Plate II Ultrastructure of ovary for female *Cherax quadricarinatus* fed experimental diets

1: Diet 1 group, $\times 12\ 000$, yolk granules. 2: Diet 1 group, $\times 10\ 000$, yolk granules. 3: Diet 2 group, $\times 10\ 000$, the lipid droplets and yolk granules. 4: Diet 3 group, $\times 10\ 000$, the lipid droplets and yolk granules. 5: Diet 3 group, $\times 8\ 000$, the formation of yolk granules and lipid droplets. 6: Diet 4 group, $\times 8\ 000$, yolk granules. 7: Diet 4 group, $\times 8\ 000$, the lipid droplets, yolk granules and follicle cells. 8: Diet 5 group, $\times 8\ 000$, yolk granules. 9: Diet 5 group, $\times 12\ 000$, yolk granules. Fc: Follicle cells; L: Lipid droplets; Y: Yolk granules.