

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2018.17444

中华绒螯蟹的摄食节律

贾二腾¹, 闫明军², 赖起铨², 罗文涛², 蒋广震¹, 刘文斌¹, 张定东¹

1. 南京农业大学 动物科技学院, 江苏省水产动物营养重点实验室, 江苏 南京 210095;

2. 南京农业大学 无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081

摘要: 为了探究中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)最适宜的投喂时间, 本实验将 120 只初重约 68 g 的幼蟹随机分养在 24 个塑料缸(70 cm×40 cm×50 cm)中。采用一次饱食投喂(将昼夜分为 8 个时间点: 10:00、13:00、16:00、19:00、22:00、01:00、04:00、07:00, 每个时间段作为 1 个处理组, 每天每个处理组饱食投喂 1 次)的方法研究中华绒螯蟹的昼夜摄食节律。结果显示, 幼蟹在不同投喂时间点表现出 24 h 周期性的摄食节律, 且总摄食高峰期在 22:00。从其中 6 d 的平均摄食量可以看出, 河蟹主要在 19:00~22:00 时间段摄食; 在肝胰腺酶活性方面, 淀粉酶活性在 19:00~22:00 内高于其他各组, 且在 22:00 获得最高值; 脂肪酶、碱性磷酸酶和钠钾 ATP 酶($\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$)酶活性有相似的变化趋势, 在 13:00~22:00 时间段这些酶的酶活呈现上升的趋势, 且最高值均在 22:00 获得。在相关摄食基因表达方面, 肝胰腺中 Leptin 基因的相对表达量在 22:00 点显著低于 13:00 和 16:00, 与其他各组相比差异不显著($P>0.05$); 肠道中胆囊收缩素(CCK)基因的相对表达量在 22:00 点显示出最低值, 与 10:00、13:00、04:00 和 07:00 点相比差异显著($P<0.05$)。综上所述, 中华绒螯蟹存在明显的摄食节律, 这可能与光照紧密相关, 最适宜的投喂时间为 22:00。

关键词: 中华绒螯蟹; 摄食节律; 日摄食量; 消化酶活性; 吸收酶活性; 摄食基因

中图分类号: S966

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2018)03-0546-09

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)简称河蟹, 是中国重要的养殖蟹类之一^[1]。因其肉质鲜美并具有较高的营养价值而深受广大消费者的喜爱。随着国内外消费市场的扩大, 河蟹的养殖面积正在逐渐地增加。而目前国内外对河蟹的研究主要集中在养殖、疾病预防和饲料营养等方面, 对摄食节律相关的研究仍然缺乏^[2-3]。

动物的摄食节律是建立科学投喂模式的生物学基础^[4], 它直接关系到对投喂时间、投喂方式、投喂频率等投喂策略的决定, 继而影响饲料效率和养殖水环境。而摄食节律受光照、温度、饵料等周期性变动因子的影响^[5], 并且会影响动物的摄食活动, 其中光周期是影响摄食的重要生态因子^[6]。Palmer 等^[7]发现, 远离大海的淡水十足类表现出一种基于光-暗区间而不是潮汐节律的活动

模式。Volkoff 等^[8]研究表明, 动物的生长以及对饲料的利用与肠道消化功能相关。而肠道消化吸收酶活力是其消化吸收能力的重要标识, 它们决定了对饲料消化吸收营养物质的能力^[9]。除了消化吸收酶外, 还有一些摄食基因对水产动物的摄食和生长有重要影响。其中, 胆囊收缩素(cholecystokinin, CCK)和瘦素(Leptin)引起了相当广泛的研究。CCK 是胃肠道中分泌的脑肠肽^[10], 而 Leptin 是肥胖基因的产物, 在调节食欲方面有重要作用^[11]。Dockray^[12]研究表明这两种基因的表达量在胃肠道中表达上升, 表明起到抑制食欲的作用。周志刚等^[13]认为鱼类最佳投喂时间应该从摄食节律的角度来确定, 其投喂时间应该选择在摄食的高峰时段。因此, 本研究通过测定消化吸收酶和两个摄食基因的表达, 探讨河蟹在 24 h 光

收稿日期: 2017-11-20; 修订日期: 2018-01-28。

基金项目: 江苏省农业科技自主创新项目(CX(15)1011); 江苏省水产三新工程项目(Y2014-33); 江苏省水产三新工程项目(Y2016-26)。

作者简介: 贾二腾(1991-), 女, 硕士研究生, 主要从事水产动物营养与饲料研究。E-mail: jiaerteng213@163.com

通信作者: 张定东(1975-), 男, 博士, 副教授, 主要从事水产动物生理与营养、水产养殖生态研究。E-mail: zdd_7597@njau.edu.cn

周期条件下的摄食行为, 研究河蟹最适宜的摄食时间段, 为其大规模养殖中最佳投喂时间确定提供理论依据, 同时有助于提高饲料利用率, 降低养殖水体的污染和养殖成本。

1 材料与方法

1.1 实验河蟹和饲料

本实验所用的中华绒螯蟹来自江苏省南京市南京农业大学浦口基地。实验开始前, 将 120 只幼蟹分别放在 4 个大小一致的塑料缸(150 cm×100 cm×30 cm, 长×宽×高)中暂养 7 d。期间, 每个塑料缸中放入 30 根 20 cm 长的 PVC 管作为河蟹的隐蔽物, 待河蟹适应环境后开始正式实验, 暂养用水为充分曝气的天然水, 采用 24 h 不间断充氧, 水温为(24±2)℃, pH 为 8.5~8.6, 暂养期间, 饲喂 40%蛋白的商品料, 每天投喂 2 次(8:00 和 18:00)。

1.2 实验设计

本实验采用 1 次饱食投喂的方法探究河蟹的昼夜摄食节律, 将 1 昼夜分为 8 个时间段: 10:00~13:00、13:00~16:00、16:00~19:00、19:00~22:00、22:00~01:00、01:00~04:00、04:00~07:00、07:00~10:00。每个时间段作为 1 个处理组, 每个处理组设置 3 个重复, 每天每个实验组只饱食投喂 1 次。

1.3 饲养管理

实验在 24 个塑料缸(70 cm×40 cm×50 cm, 长×宽×高)内进行, 每个缸内放 5 根 15 cm 的 PVC 管。河蟹在暂养池驯养 1 周后, 饥饿 1 天, 从中随机挑选体质健壮、初重(68±2.40) g 的河蟹放入缸中, 每个缸 5 只, 设置 3 个重复。实验正式开始之前先进行 3 d 的预实验, 每个处理组进行 1 次定点饱食投喂, 每天准确称取 7 g 实验饲料。投喂 1 h 后, 将残饵用虹吸管吸出, 放入每个缸对应的培养皿里, 60℃烘干至恒重, 用以计算实验蟹的实际摄食量。实验期间, 每天测定水温, 河蟹养殖期间水温(24±2)℃, pH 8.5~8.6, 溶氧 5 mg/L, 并定期更换实验缸的水, 实验周期为 10 d。

1.4 样品采集

实验结束后, 对每个养殖缸中的幼蟹进行数

量统计。随后, 从每个缸内随机选取 3 只河蟹, 将其放在冰上进行麻醉, 然后进行肝胰腺和肠的采集。

1.5 样品的测定及分析

1.5.1 酶活的测定 肝胰腺匀浆液的制备: 准确称取肝胰腺组织, 按质量体积比加入 9 倍的生理盐水制成 10%的组织匀浆, 10000 r/min, 离心 20 min, 取组织匀浆的上清液待测。淀粉酶、脂肪酶、碱性磷酸酶(AKP)和钠钾 ATP 酶($\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$)活力均采用南京建成生物工程研究所的试剂盒进行测定。

淀粉酶酶活单位定义: 组织中每毫克蛋白在 37℃与底物作用 30 min, 水解 10 mg 淀粉定义为 1 个淀粉酶活力单位, 单位为 U/mg。

脂肪酶酶活单位定义: 在 37℃条件下, 每克组织蛋白在本反应体系中与底物反应 1 min, 每消耗 1 μmol 底物为一个酶活力单位, 单位为 U/g(prot)。

碱性磷酸酶酶活单位定义: 每克组织蛋白在 37℃与基质作用 15 min 产生 1 mg 酚为 1 金氏单位, 单位为金氏单位/gprot。

$\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活单位定义: 规定每小时每毫克组织蛋白的组织中 ATP 酶分解 ATP 产生 1 μmol 无机磷的量为 1 个 ATP 酶活单位, 单位为 $\mu\text{mol}(\text{Pi})/(\text{mg} \cdot \text{h})$ 。

1.5.2 组织中基因表达分析 根据 NCBI GenBank 中已登录的哺乳动物、鸡、大西洋鳕、斑马鱼等物种的 Leptin 和 cholecystokinin (CCK)基因的 cDNA 序列保守区域, 设计一套用于扩增中间片段的引物, 各有 1 条上游引物和 1 条下游引物。引物序列见表 1。运用实时定量检测技术检测 Leptin 和 CCK 在河蟹肝胰腺和肠中的分布情况。

(1)RNA 提取: 取大概 0.1 g 左右组织样品, 根据 RNAiso Plus(TaKaRa Co. Ltd, 大连, 中国)说明书从肝胰腺和肠中提取总 RNA。用 NanoDrop 2000 分光光度计(Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE)测量总 RNA 浓度和纯度, 当 A_{260}/A_{280} 比例在 1.8 和 2.0 之间时, 提取的 RNA 样品可以用于后续分析。

(2)cDNA 的反转录: 按照大连宝生物公司提供的试剂盒进行反转录, 反应程序: 第一步 37℃, 15 min; 第二步 85℃, 5 s; 最后 4℃保存。

(3)RT-PCR 过程: 用 primer 5 软件设计引物, 并由上海英捷公司合成(表 1), 然后用 DEPC 水稀释, 根据大连宝生物公司提供的试剂盒进行操作, 反应程序: 94℃预热 5min; 94℃变性 30 s, 55.9℃退火 30 s, 72℃延伸 30 s, 30 个循环(每个循环中); 72℃延伸 7 min。选用 β -actin 作为内参基因^[14], 用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法计算 Leptin 和 CCK 基因的相对表达量。

表 1 本研究所用引物序列
Tab.1 The sequences of primers used in the study

名称 name	序列(5'-3') sequence(5'-3')
β -actin (F)	GCATCCACGAGACCACTTACA
β -actin (R)	CTCCTGCTTGCTGATCC ACATC
Leptin (F)	GCGAGGCCCCAGAAGCACATC
Leptin (R)	GGTGACAATCGTCTTGATGAG
CCK (F)	AGCAACAACAACTGCCGAC
CCK (R)	TCTATCGTGCGAAAGTGCCT

1.6 计算及统计分析

溶失率 = m_0/m_1

日摄食量(g) = 日投喂量 - 溶失率 × 剩余饲料干重

均摄食量(g) = 日摄食量/只数

总摄食量(g) = 日摄食量 × 养殖天数

残饵的溶失率测定方法: 向无河蟹的缸中投入与实验期间投喂相同重量的饲料重 m_0 , 1 h 后, 用虹吸管收集饲料, 在 60℃下烘干至恒重, 称取重量为 m_1 , 计算溶失率。其结果用以校正和计算每个缸实验蟹的摄食量。所有实验数据先经过正态性检验和同质性检验, 然后对平均值进行单因素方差分析(one-way ANOVA), 在 $P<0.05$ 时检验差异显著。所有统计分析均由 Statistical 23. for Mac 完成。

2 结果与分析

2.1 不同时间点饱食投喂下中华绒螯蟹的摄食节律

由图 1 可见每天 1 次饱食投喂下, 不同时间点的摄食情况, 中华绒螯蟹在 22:00 摄食量最高, 其次是 19:00 和 01:00, 04:00 和 07:00 的摄食量显著低于 19:00、22:00 和 01:00 的摄食量($P<0.05$)。

综合 1~6 d 的平均日摄食量可以看出, 中华绒螯蟹表现出以 24 h 为周期的摄食节律, 摄食高峰值出现在 19:00~01:00(图 2)。

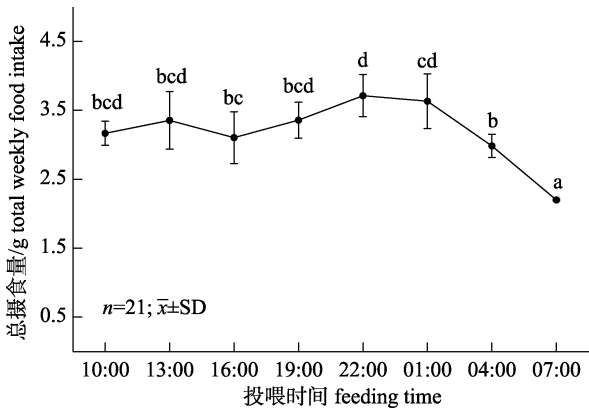


图 1 在 1 次饱食投喂下河蟹 1 周总摄食量的变化
图中不同小写英文字母表示在 1 次饱食投喂下, 每个取样时间点所得数据之间差异显著 ($P<0.05$)。

Fig. 1 Variations of total weekly food intake of *Eriocheir sinensis* under a once-per-day satiation feeding
Means with different lowercase letters are significantly different at 0.05 level under a once-per-day satiation feeding at each sampling time point.

2.2 不同时间点饱食投喂对中华绒螯蟹消化酶活性的影响

从图 3 中可以看出, 中华绒螯蟹摄食后, 在 10:00~22:00 这个时间段, 淀粉酶活性出现上升的趋势, 其活性在 22:00 达到了最高值, 与 10:00、13:00 和 16:00 淀粉酶活性相比显著差异($P<0.05$), 而在 22:00~01:00 时间段淀粉酶活性出现下降的趋势。脂肪酶活性与淀粉酶活性出现相似的结果, 其活性在 22:00 点达到最高, 与其他组酶活性相比出现显著差异($P<0.05$)。在 10:00 到 16:00 时间段, 各时间点之间脂肪酶活性差异不显著($P>0.05$)。

2.3 不同时间点饱食投喂对中华绒螯蟹碱性磷酸酶和 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性的影响

由图 4 可知, 与其他各时间点相比, 22:00 点饱食投喂显示出最高的碱性磷酸酶活性($P<0.05$); 而 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性呈现先升高后降低的趋势, 在 19:00 到 22:00 时间段, 显示出更高的酶活性, 与其他各组相比差异显著($P<0.05$), 但是在 19:00、22:00 和 01:00 各组之间差异不显著($P>0.05$)。

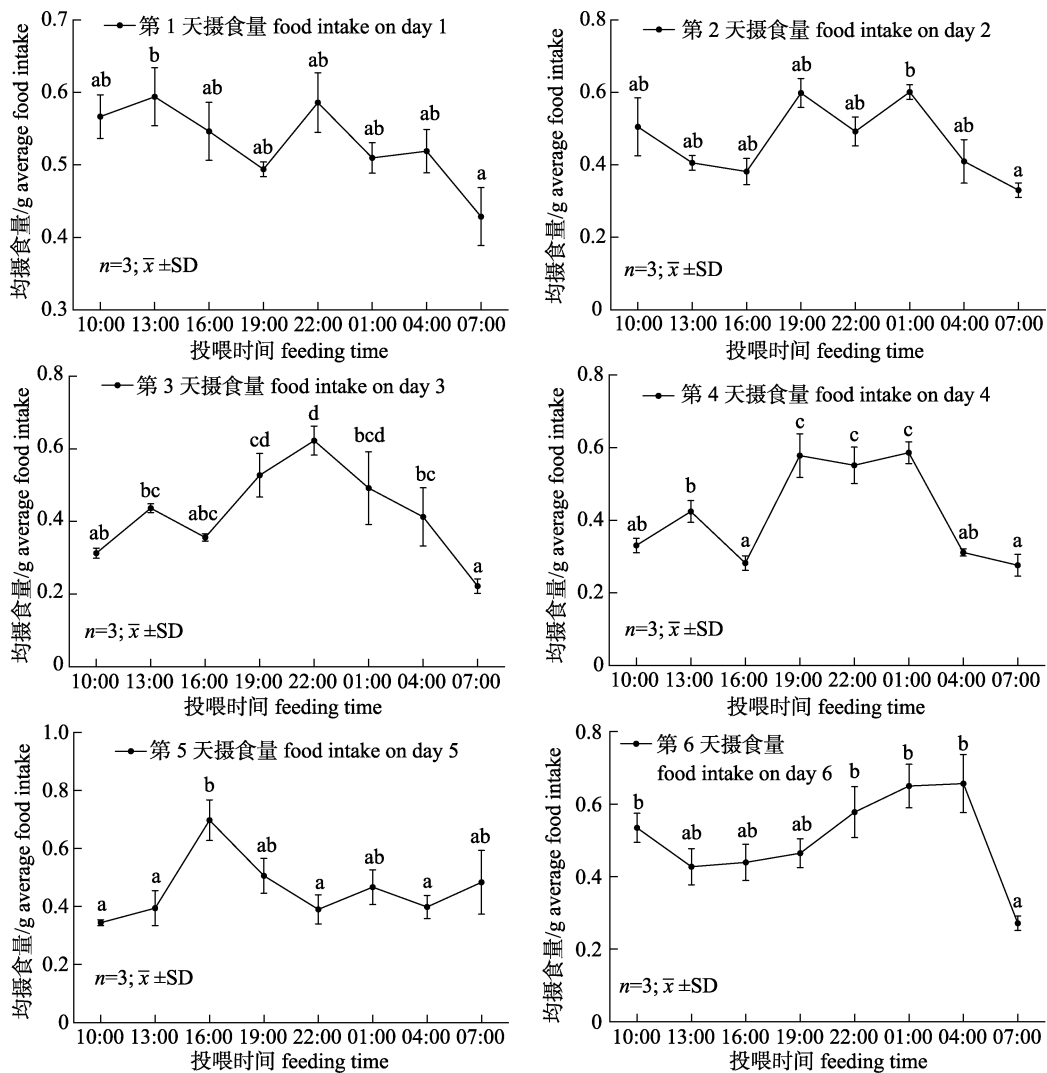


图 2 在 1 次饱食投喂下 126 d 河蟹每天摄食量的变化

图中不同小写英文字母表示在 1 次饱食投喂下, 每个取样时间点所得数据之间差异显著($P < 0.05$).

Fig. 2 Variations of daily food intake of *Eriocheir sinensis* under a once-per-day satiation feeding Means with different lowercase letters are significantly different at 0.05 level under a once-per-day satiation feeding at each sampling time point.

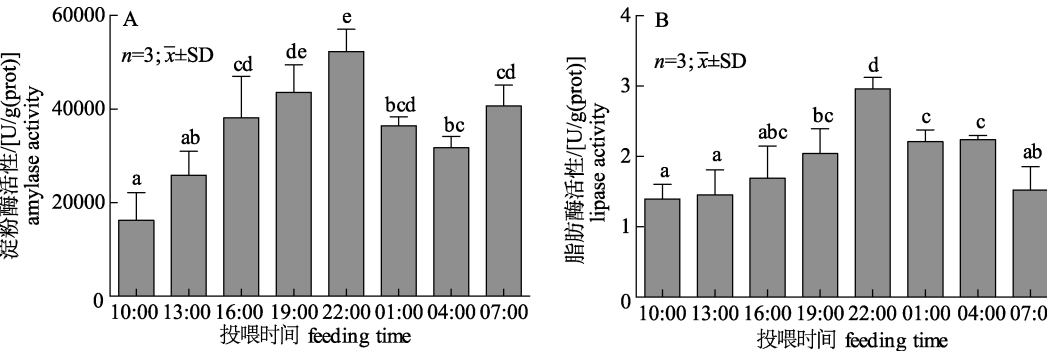


图 3 不同时间点消化酶活性的变化趋势

A. 淀粉酶活性; B. 脂肪酶活力. 图中不同小写英文字母表示在 1 次饱食投喂下, 每个取样时间点所得数据之间差异显著($P < 0.05$).

Fig.3 The change trend of digestive enzyme activity at different time

A. Amylase activity; B. Lipase activity. Means with different lowercase letters are significantly different at 0.05 level under a once-per-day satiation feeding at each sampling time point.

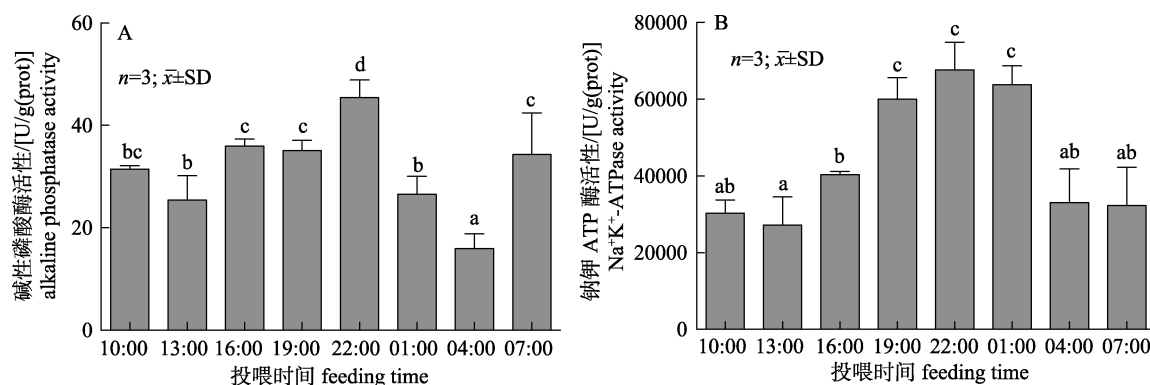


图 4 不同时间点碱性磷酸酶和 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性的变化趋势

A. 碱性磷酸酶; B. $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶. 图中不同小写英文字母表示在 1 次饱食投喂下, 每个取样时间点所得数据之间差异显著 ($P<0.05$).

Fig. 4 The change trend of AKP and $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ ase activities at different time

A. AKP activity; B. $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ ase activity. Means with different lowercase letters are significantly different at 0.05 level under a once-per-day satiation feeding at each sampling time point.

2.4 不同时间点饱食投喂对中华绒螯蟹摄食基因的影响

通过检测 Leptin 和 CCK 基因分别在肝胰腺和肠中的表达情况, 从而分析河蟹在不同时间段的采食状况。从图 5a 可以看出, 在 22:00 点 Leptin 基因表达量最低, 与 13:00 和 16:00 的表达量相比

差异显著 ($P<0.05$), 与其他各组相比差异不显著。从图 5b 可以看出, 随着光线的变暗, CCK 基因表达量逐渐降低, 在 22:00 点投喂时 CCK 基因表达量最低, 与 10:00、13:00、04:00 和 07:00 点相比差异显著 ($P<0.05$), 与 16:00、19:00 和 01:00 点相比差异不显著 ($P>0.05$)。

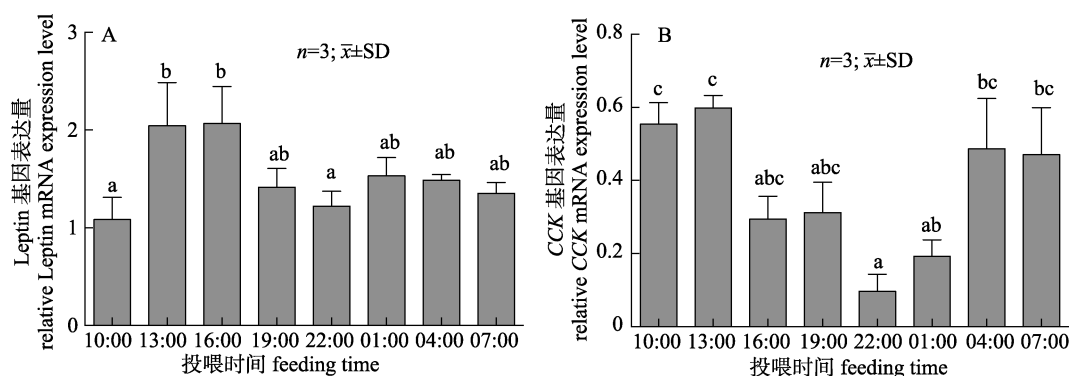


图 5 不同时间点 Leptin(A)和 CCK(B)基因分别在肝胰腺和肠中的表达情况

图中不同小写英文字母表示在 1 次饱食投喂下, 每个取样时间点所得数据之间差异显著 ($P<0.05$).

Fig. 5 Relative expressions of Leptin (A) and CCK (B) gene in hepatopancreas and intestine at different time
Means with different lowercase letters are significantly different at 0.05 level under a once-per-day satiation feeding at each sampling time point.

3 讨论

3.1 中华绒螯蟹的摄食节律

从本实验的结果可以看出, 河蟹昼夜摄食节律较强, 从下午 16:00 开始, 平均摄食量逐渐上升, 持续到晚上 22:00, 之后逐渐降低。这与王吉桥等^[15]研究结果相似, 幼蟹的摄食高峰在 18:00~20:00

间, 且摄食节律曲线明显。同时, 与月鳢(*Channa asiatica*)^[16]、克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)^[17]等底层鱼、虾类的摄食节律也较相同, Reymond 等^[18]研究表明日本对虾每天呈现夜间活动的摄食模式, 这可能与养殖物种的视觉不发达有关。而宝石鲈(*Scortum barcoo*)^[19]、鲢、鳙^[20]、斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)^[21]的摄食高峰期是在

白天,斜带石斑鱼的摄食高峰期在下午 14:00。这也说明甲壳类动物和鱼类在日常活动和喂养模式中存在很大的种间差异性,因此鱼类的摄食特性对于河蟹的养殖不具有参考价值。根据河蟹的摄食节律可以看出,河蟹昼伏夜出,晚间摄食。因此可以选择在 19:00~22:00 时间段投喂 1 次即可,过早投喂,蟹未开始摄食,会造成饵料的损失,增加养殖成本。

3.2 不同时间点饱食投喂对中华绒螯蟹消化酶活性的影响

河蟹的肝胰腺在营养物质消化与吸收过程中起着重要的作用^[22]。迄今为止,甲壳动物肝胰腺消化酶活性已经被广泛研究,其活性高低决定对营养物质消化吸收的能力^[23],但是消化酶活性与摄食节律之间的关系尚不清楚。本实验探究了不同投喂时间点对淀粉酶和脂肪酶的影响。由于消化酶如淀粉酶和脂肪酶是反映饲料利用率和动物生长的关键因素^[24-25],其活性与食性、生长环境和饵料等因素密切相关^[26-28]。本研究结果表明,在光线较强的 10:00~13:00 时段消化酶活性均为最低;其后,在 16:00~22:00 消化酶活性又随之增强,并在 22:00 点消化酶活性最高,进一步说明河蟹的摄食高峰期可能是在夜间。王帅等^[29]研究表明叶尔羌高原鳅的摄食高峰期出现在 23:00~02:00,在这个时段淀粉酶和脂肪酶活性较高,与本研究的结果相似。

3.3 不同时间点饱食投喂对中华绒螯蟹吸收酶活性的影响

本实验研究表明不同投喂时间点对 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 两种吸收酶活力有一定的影响,赵峰等^[30]研究表明 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶的主要功能是维持细胞膜的离子通透性,保持细胞内环境中各种离子浓度的相对稳定。一些营养物质,例如氨基酸和葡萄糖的吸收与 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶对 Na^+ 的吸收有关,这种酶能够间接反映吸收能力^[31]。Villanueva 等^[32]研究表明 AKP 被认为在脂质和葡萄糖吸收中起着至关重要的作用,碱性磷酸酶的高低在一定程度上反映了河蟹肝胰腺吸收功能的强弱,从本实验结果可以看出,AKP 和 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性最高值均在 22:00 获得,与总摄食量和消化酶活性有相似的趋势,说明在这个时间点河蟹消化吸

收能力较强。

3.4 不同时间点投喂下 Leptin 和 CCK 基因表达情况

由于 Leptin 和 CCK 参与调节摄食,在许多脊椎动物中,包括鱼类,它们被认为是一种饱感因子,能够减少摄食量,缩短摄食时间和刺激终止进食^[33-34],它的降低会使动物的摄食量增加,这与水产动物研究结果相似。本研究测定了肝胰腺中 Leptin 和肠道中 CCK 基因的表达量,结果显示在 22:00 时间点 Leptin 和 CCK 基因表达量最低,这与河蟹摄食量的测定结果相反,说明这两个基因表达量下调可使河蟹的摄食量增加。Murashita 等^[35]研究表明 Leptin 可显著抑制虹鳟的摄食行为、刺激抑制食欲因子阿片促黑色素原 A1/A2 (proopiomelanocortin-A1/A2, POMC-A1/A2) 基因表达并降低促食欲因子神经肽 Y (neuropeptide Y, NPY) 基因的表达水平。Himick 等^[36]和 Volkoff 等^[37]研究表明,在金鱼的中枢神经系统 and 外周注射 CCK-8 能够减少摄食量,而 G lineau 等^[38]研究表明,在虹鳟上注射 CCK 拮抗剂可以增加鱼的摄食量。

综上所述,本研究表明在 22:00 投喂能够增强消化和吸收酶的活性,且在 19:00~22:00 时间段投喂,可以提高河蟹的采食量和饲料效率。

参考文献:

- [1] He J, Wu X, Li J, et al. Comparison of the culture performance and profitability of wild-caught and captive pond-reared Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) juveniles reared in grow-out ponds: Implications for seed selection and genetic selection programs[J]. Aquaculture, 2014, 434: 48-56.
- [2] Jia E T, Li Z Q, Xue Y F, et al. Effects of dietary fructooligosaccharide on the growth, antioxidants, immunity and disease resistance of Chinese mitten crab[J]. Aquaculture, 2017, 481: 154-161.
- [3] Wang W. Bacterial diseases of crabs: a review[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2011, 106(1): 18-26.
- [4] Wang J Y. Aquaculture on the control measures of ecological environment pollution[J]. Journal of Beijing Fisheries, 2004(4): 4-6. [王君英. 水产养殖对生态环境污染的控制措施[J]. 北京水产, 2004(4): 4-6.]
- [5] Yan Z H, Liu C Q, Wang J X, et al. Effects of starvation on

- feeding rhythm of shrimp *Macrobrachium nipponense*[J]. Sichuan Journal of Zoology, 2008, 27(5): 843-844. [闫智恒, 刘存歧, 王军霞, 等. 饥饿对日本沼虾摄食节律的影响[J]. 四川动物, 2008, 27(5): 843-844.]
- [6] Sánchez-Vázquez F J, Zamora S, Madrid J A. Light-dark and food restriction cycles in sea bass: effect of conflicting zeitgebers on demand-feeding rhythms[J]. Physiology & Behavior, 1995, 58(4): 705-714.
- [7] Palmer J D. Tidal rhythms: The clock control of the rhythmic physiology of marine organisms[J]. Biological Reviews, 1973, 48(3): 377-418.
- [8] Volkoff H, Canosa L F, Unniappan S, et al. Neuropeptides and the control of food intake in fish[J]. General and Comparative Endocrinology, 2005, 142(1-2): 3-19.
- [9] Wu Y, Liu W B, Li H Y, et al. Effects of dietary supplementation of fructooligosaccharide on growth performance, body composition, intestinal enzymes activities and histology of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) fingerlings[J]. Aquaculture Nutrition, 2013, 19(6): 886-894.
- [10] Boguszewski C L, Paz-Filho G, Velloso L A. Neuroendocrine body weight regulation: integration between fat tissue, gastrointestinal tract, and the brain[J]. Endokrynologia Polska, 2010, 61(2): 194-206.
- [11] Arora S, Anubhuti. Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity—A review[J]. Neuropeptides, 2006, 40(6): 375.
- [12] Dockray G J. Cholecystokinin[J]. Current Opinion in Endocrinology Diabetes and Obesity, 2012, 19(1): 8.
- [13] Zhou Z G, Xie S Q, Cui Y B, et al. Establishment of optimum feeding time in *Carassius auratus gibelio*[J]. Feed China, 2003(13): 37-39. [周志刚, 解绶启, 崔奕波, 等. 异育银鲫适宜投喂时间的建立[J]. 饲料广角, 2003(13): 37-39.]
- [14] Yang J, Wang L, Huang M, et al. An interleukin-2 enhancer binding factor 2 homolog involved in immune response from Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 30(6): 1303-1309.
- [15] Wang J Q, Pang P M, Yu J, et al. Studies on the food selectivity, consumption and feeding rhythm of the Chinese crab *Eriocheir sinensis*[J]. Journal of Hydroecology, 2000, 20(4): 6-7. [王吉桥, 庞璞敏, 于静, 等. 中华绒螯蟹对食物的选择性、摄食量及摄食节律的研究[J]. 水生态学杂志, 2000, 20(4): 6-7.]
- [16] Yang D Q, Chen F, Fang C Y, et al. A study on feeding habits of larval *Channa asiatica* under culturing environments[J]. Journal of Hydroecology, 1999, 19(2): 5-7. [杨代勤, 陈芳, 方长琰, 等. 饲养条件下月鳢仔鱼摄食习性的研究[J]. 水生态学杂志, 1999, 19(2): 5-7.]
- [17] Xu Z H, Zhou X, Shui Y. Food preference and feeding rhythm in red swamp crayfish *Procambarus clarkii*[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2012, 27(2): 166-170. [徐增洪, 周鑫, 水燕. 克氏原螯虾的食物选择性及其摄食节律[J]. 大连海洋大学学报, 2012, 27(2): 166-170.]
- [18] Reymond H, Lagardère J P. Feeding rhythms and food of *Penaeus japonicus* Bate (Crustacea, Penaeidae) in salt marsh ponds; role of halophilic entomofauna[J]. Aquaculture, 1990, 84(2): 125-143.
- [19] Sun Y S, Zhang X Q, Shi D J, et al. Feeding rhythm and daily food intake of jade perch *Scortum barcoo*[J]. Fisheries Science, 2012, 31(1): 28-31. [孙砚胜, 张秀倩, 史东杰, 等. 宝石鲈摄食节律和日摄食率的初步研究[J]. 水产科学, 2012, 31(1): 28-31.]
- [20] Li S F, Yang H Q, Lu W M. Preliminary research on diurnal feeding rhythm and the daily ration for silver carp, bighead carp and grass carp[J]. Journal of Fisheries of China, 1980, 4(3): 275-283. [李思发, 杨和荃, 陆伟民. 鲢、鳙、草鱼摄食节律和日摄食率的初步研究[J]. 水产学报, 1980, 4(3): 275-283.]
- [21] Zhang H F, Liu X C, Lin H R, et al. Studies on feeding rhythm and daily feeding amount of larval *Epinephelus coioides*[J]. Journal of Fisheries of China, 2004, 28(6): 669-674. [张海发, 刘晓春, 林浩然, 等. 斜带石斑鱼仔鱼的摄食节律及日摄食量[J]. 水产学报, 2004, 28(6): 669-674.]
- [22] Zhou Y K, Liu L H, Chen L Q, et al. Changes of the digestive enzyme activities in the liver and pancreas of crabs during the ovary development[J]. Journal of Hydroecology, 2005, 25(2): 19-21. [周永奎, 刘立鹤, 陈立侨, 等. 卵巢发育过程中河蟹肝胰腺消化酶活力的变化[J]. 水生态学杂志, 2005, 25(2): 19-21.]
- [23] Liu H, Ji C H, Shi Z F, et al. Effect of temperature on activity of protein digestive enzyme of striped bass[J]. Fisheries Science & Technology Information, 1998(3): 103-107. [刘红, 汲长海, 施正峰, 等. 温度对条纹石鲈蛋白消化酶活性影

- 响的初步研究[J]. 水产科技情报, 1998(3): 103-107.]
- [24] Debnath D, Pal A K, Sahu N P, et al. Digestive enzymes and metabolic profile of *Labeo rohita* fingerlings fed diets with different crude protein levels[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2007, 146(1): 107-114.
- [25] Mohanta K N, Mohanty S N, Jena J K, et al. Protein requirement of silver barb, *Puntius gonionotus* fingerlings[J]. Aquaculture Nutrition, 2010, 14(2): 143-152.
- [26] Wu T T, Zhu X M. Studies on the activity of digestive enzymes in mandarin fish, black carp, grass carp, common carp, crucian carp and silver carp[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 1994, 1(2): 10-17. [吴婷婷, 朱晓鸣. 鳊鱼, 青鱼, 草鱼, 鲤, 鲫, 鲢消化酶活性的研究[J]. 中国水产科学, 1994, 1(2): 10-17.]
- [27] Wu L, Chen P F, Xing K C, et al. Studies on the activities of major intestine and hepatopancreas digestive enzymes in *Monopterus albus*[J]. Journal of Hubei Agricultural College, 2002, 22(1): 36-39. [伍莉, 陈鹏飞, 幸坤财, 等. 黄鳝肠道和肝胰脏主要消化酶活性的研究[J]. 湖北农学院学报, 2002, 22(1): 36-39.]
- [28] Yang D Q, Yan A S, Chen F, et al. Effects of different diets on activities of digestive enzymes of *Monopterus albus*[J]. Journal of Fisheries of China, 2003, 27(6): 558-563. [杨代勤, 严安生, 陈芳, 等. 不同饲料对黄鳝消化酶活性的影响[J]. 水产学报, 2003, 27(6): 558-563.]
- [29] Wang S, Song Y, Ren D Q, et al. Feeding rhythms of ingestion and digestive enzyme activity in *Triplophysa (Hedinichthys) yarkandensis* under culturing condition[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2016, 44(11): 264-267. [王帅, 宋勇, 任道全, 等. 养殖条件下叶尔羌高原鳊摄食及主要消化酶活性的昼夜节律[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(11): 264-267.]
- [30] Zhao F, Zhuang P, Zhang L Z, et al. The influence of salinity acclimation on activity of Na^+/K^+ -ATPase in branchial epithelium, concentration of ions and osmolarity in serum of *Acipenser schrenckii*[J]. Journal of Fisheries of China, 2006, 30(4): 444-449. [赵峰, 庄平, 章龙珍, 等. 盐度驯化对史氏鲟鳃 Na^+/K^+ -ATP 酶活力、血清渗透压及离子浓度的影响[J]. 水产学报, 2006, 30(4): 444-449.]
- [31] Rhoads J M, Chen W, Chu P, et al. L-glutamine and L-asparagine stimulate $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ exchange in porcine jejunal enterocytes[J]. American Journal of Physiology, 1994, 266(5): G828-G838.
- [32] Villanueva J, Vanacore R, Goicoechea O, et al. Intestinal alkaline phosphatase of the fish *Cyprinus carpio*: Regional distribution and membrane association[J]. Journal of Experimental Zoology, 1997, 279(4): 347-355.
- [33] Friedman J M, Halaas J L. Leptin and the regulation of body weight in mammals[J]. Nature, 1998, 395(6704): 763-770.
- [34] Chaudhri O, Small C, Bloom S. Gastrointestinal hormones regulating appetite[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, 2006, 361(1471): 1187-1209.
- [35] Murashita K, Uji S, Yamamoto T, et al. Production of recombinant leptin and its effects on food intake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2008, 150(4): 377-384.
- [36] Himick B A, Peter R E. CCK/gastrin-like immunoreactivity in brain and gut, and CCK suppression of feeding in goldfish[J]. American Journal of Physiology, 1994, 267(2): 841-851.
- [37] Volkoff H, Eykelbosh A J, Peter R E. Role of leptin in the control of feeding of goldfish *Carassius auratus*: interactions with cholecystokinin, neuropeptide Y and orexin A, and modulation by fasting[J]. Brain Research, 2003, 972(1): 90-109.
- [38] G lineau A, Boujard T. Oral administration of cholecystokinin receptor antagonists increase feed intake in rainbow trout[J]. Journal of Fish Biology, 2001, 58(3): 716-724.

Feeding rhythm of the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)

JIA Erteng¹, YAN Mingjun², LAI Qicheng², LUO Wentao², JIANG Guangzhen¹, LIU Wenbin¹, ZHANG Dingdong¹

1. Key Laboratory of Aquatic Nutrition of Jiangsu Province, College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China

Abstract: The Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) is a native and important cultured freshwater that is widely distributed in the Yangtze Estuary, China. Many scholars have focused on crab farming, disease prevention, and diet. However, little is known about the feeding rhythm of Chinese mitten crabs, in regards to feeding mode, which is directly related to the feeding time, feeding method, and frequency of feeding strategies, which may affect feed efficiency, as well as aquaculture water. Accordingly, the present study investigated crab feeding behavior under a 24-h photoperiod and, ultimately, established a theoretical basis for determining optimal feeding time, which could benefit large-scale aquaculture and, therefore, improve feed utilization and reduce both water pollution and breeding costs. Crabs with weight of (68.0 ± 2.4) g were randomly distributed among 24 cement pools ($0.7 \text{ m} \times 0.4 \text{ m} \times 0.5 \text{ m}$, L×W×H). Each group had three cement pools replicates, each housing 5 crabs, and fed at different time points (10:00, 13:00, 16:00, 19:00, 22:00, 01:00, 04:00, and 07:00). After 10 d, three crabs from each pool were randomly selected and sampled for intestinal and hepatopancreas. The results showed that juvenile crabs exhibited different feeding patterns at different feeding times, and the peak of feeding was observed at 22:00. Based on the average food intake over 6 d, it was clear that the crabs fed primarily at 19:00–22:00. Meanwhile, amylase activity was higher in the hepatopancreas samples of crabs fed at 22:00 than in those of crabs fed at other times (except 19:00). Lipase, alkaline phosphatase, and $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ activities increased from 13:00 to 22:00 and decreased thereafter. Leptin expression in the hepatopancreas of crabs fed at 22:00 p.m. was significantly lower than that of crabs fed at either 13:00 or 16:00, whereas cholecystokinin (CCK) expression was lowest in the intestines of crabs fed at 22:00. In conclusion, feeding of Chinese mitten crab was with an increasing feed intake at 16:00; there after tend to decrease at 22:00. This could be attributed to the visual underdevelopment of the crabs. According to the observed feeding rhythm, Chinese mitten crabs are nocturnal and feed at night. The activities of digestion and absorption enzymes were lowest in crabs fed at 10:00–13:00 and increased from 16:00 to 22:00, with the highest level attained at 22:00. These results could indicate a strong the ability of nutrients digestion and absorption at 22:00. It was consistent with the trend of total feed intake. Digestive and absorption capacity are important indicators of feed utilization and animal growth, and enzyme activity can be used as an indicator of digestive and absorption capacity. On the contrary, the expression of leptin and CCK were downregulated at 22:00. These results were supported by the fact that leptin and CCK are involved in the regulation of food intake. According to previous studies, decreases in leptin and CCK increase the feed intake of animals, which also explains the why, in the present study, the highest feed intake was observed at 22:00. Overall, feeding Chinese mitten crabs at 22:00 could enhance digestion and absorption. Therefore, feeding at 19:00–22:00 could improve feed intake and efficiency.

Key words: *Eriocheir sinensis*; feeding rhythm; daily food intake; digestion enzyme activity; absorption enzyme activity; feeding gene

Corresponding author: ZHANG Dingdong. E-mail: zdd_7597@njau.edu.cn