

文章编号:1000 - 0615(2002)06 - 0533 - 09

维生素 E、C 和 HUFA 交互作用对中华绒螯蟹 生殖性能的影响

艾春香, 陈立侨, 温小波, 周忠良, 王 群

(华东师范大学生命科学学院, 上海 200062)

摘要:通过投喂添加或不添加 V_E 、 V_C 和 HUFA 的四组实验饲料, 经 198d 饲养实验, 以雌蟹的性腺系数、产卵力、孵化率、各组织超氧化物歧化酶(SOD)活性和过氧化产物丙二醛(MDA)含量等为指标, 研究这两类营养素交互作用对其生殖性能的影响。结果表明, V_E 、 V_C 和 HUFA 对雌蟹生殖性能有显著的影响 ($P < 0.05$): 在产卵力方面, 1 组为 3790 个卵细胞 $\cdot g^{-1}$ 体重, 极显著高于 2 组(为 2317 个卵细胞 $\cdot g^{-1}$ 体重)和 3 组(为 2129 个卵细胞 $\cdot g^{-1}$ 体重) ($P < 0.01$), 显著高于 4 组(为 3050 个卵细胞 $\cdot g^{-1}$ 体重)和 5 组(对照组)(为 3010 个卵细胞 $\cdot g^{-1}$ 体重) ($P < 0.05$); 而孵化率方面, 1 组(86.17%) 极显著高于 2 组(36.06%)、3 组(29.18%) 和 4 组(25.73%) ($P < 0.01$), 也显著高于 5 组(71.12%) ($P < 0.05$)。1 组和 2 组雌蟹性腺中 SOD 活性分别为 $40.09 \text{Nu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $39.87 \text{Nu} \cdot \text{mL}^{-1}$, 相应地, MDA 含量分别为 $6.87 \text{nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $3.33 \text{nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$; 而 3 组和 4 组雌蟹, 尽管其性腺中 SOD 活性较高, 分别为 $79.21 \text{Nu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $85.2 \text{Nu} \cdot \text{mL}^{-1}$, 但由于饲料中抗氧化性 V_E 、 V_C 的缺乏, 导致脂质过氧化发生, 其 MDA 含量显著增加 ($P < 0.05$), 分别为 $12.65 \text{nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $25.18 \text{nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。4 组雌蟹的产卵力较大, 但因 V_E 、 V_C 的缺乏发生脂质过氧化, 导致所产的卵质低下, 从而影响了卵子的孵化率。结果表明, V_E 、 V_C 和 HUFA 都是河蟹保持良好的生殖性能的必需营养成分。

关键词:中华绒螯蟹; 维生素 E、C; 高不饱和脂肪酸; 交互作用; 生殖性能

中图分类号: S917; S963 文献标识码: A

Effect of vitamin E and vitamin C, highly unsaturated fatty acids, in broodstock diet on reproduction performance of *Eriocheir sinensis*

AI Chun-xiang, CHEN Li-qiao, WEN Xiao-bo, ZHOU Zhong-liang, WANG Qun

(School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract: 198-day feeding trials were conducted to determine the reciprocal physiological effects on Chinese mitten-handed crabs *Eriocheir sinensis* female broodstock by feeding with four experiment diets and one control group diet for: diet 1 supplementing HUFA and vitamin E, C; diet 2 supplementing only vitamin E and C; diet 3 supplementing neither HUFA nor vitamin E and C; diet 4 supplementing only HUFA, diet 5 (control group diet) was fresh clam. The results showed that vitamin E, vitamin C and HUFA were essential components in

收稿日期: 2002-04-10

基金项目: 上海市“曙光计划”基金项目(975G06); 高等学校博士点专项基金项目(2000026903)

作者简介: 艾春香(1967-), 男, 江西永丰人, 博士, 讲师, 现在厦门大学海洋与环境学院从事博士后研究工作, 主要从事水生动物营养生理研究。E-mail: chunxai@sina.com

通讯作者: 陈立侨(1962-), 男, 广东梅州人, 教授, 博导。021-62233637, E-mail: lqchenc@online.sh.cn

broodstock diets. Fecundity and hatchability of eggs from broodstock crabs fed with diet 1 in which HUFA and vitamin E, C were supplemented were $3790 \text{ egg cell} \cdot \text{g}^{-1}$ and 86.17% respectively, were the very significantly higher than those of broodstock crabs fed with HUFA-deficient diet like diet 2 and 3 ($2317 \text{ egg cell} \cdot \text{g}^{-1}$, 36.06% and $2129 \text{ egg cell} \cdot \text{g}^{-1}$, 29.18%) ($P < 0.01$), and significantly higher than those of and fecundity and hatchability of eggs ($3050 \text{ egg cell} \cdot \text{g}^{-1}$ and 25.73% in diet 4 treatment) from the crabs fed with diet 4 were also lower than those of control group ($3010 \text{ egg cell} \cdot \text{g}^{-1}$ and 71.12% respectively) ($P < 0.05$). When the broodstock crabs were fed with vitamin E and C-deficient diets like diet 3 and 4, lipids of crabs were peroxidized with decreasing SOD activity and increasing MDA content. Meanwhile, the effect of total lipid content, fatty acid composition and vitamin E and C concentrations of experimental diets on those of corresponding eggs, and the lipid peroxidation in eggs are discussed. The results of this study indicate both HUFA and vitamin E, C are indispensable and cooperative to egg developing of crab and must be supplemented in the broodstock crab diet.

Key words: *Eriocheir sinensis*; vitamin E and vitamin C; highly unsaturated fatty acids (HUFA); reciprocal effects; reproduction performance

已有研究表明,亲体的营养状况极大地影响其生殖力,也直接影响卵子的数量和质量、胚胎发育以及其后续自营养阶段幼体发育的整个过程^[1,2]。然而迄今,对甲壳动物亲体的营养需求缺乏全面了解,导致尚未能生产出可以满足其生殖营养需求的实用配合饲料^[3,4],进而影响了批量繁育高质量的幼体^[5]。尽管高不饱和脂肪酸(Highly unsaturated fatty acids, HUFA)和维生素对甲壳动物生殖性能的影响已分别做了一些工作^[3,6]。迄今,有关维生素和 HUFA 交互作用对其生殖性能影响的研究尚未见到正式报道。

本实验以我国重要的淡水养殖经济甲壳动物——中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*, 河蟹)为实验对象,着重探讨了维生素 E (vitamin E, V_E)、维生素 C (vitamin C, V_C) 和 HUFA 交互作用对雌蟹性腺成熟、产卵力和孵化率等的影响,以期了解 V_E 、 V_C 和 HUFA 交互作用对雌蟹生殖活动的生理作用,为配制生殖期河蟹全价配合饲料提供科学依据,这不仅对促进健康苗种的批量培育有着重要的现实意义,同时,也可作为甲壳类生殖营养学积累基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验用蟹

将捕获于上海市崇明岛的 350 只池养雌亲蟹运至华东师范大学水生动物饲养实验室,投放到 $1\text{m} \times 1\text{m} \times 1\text{m}$ 的水泥池中一周适应性暂养后,挑选 300 只附肢完整、活性强、卵巢发育处于 期的雌蟹用于试验^[7]。将挑选好的雌蟹随机分成 15 组,每组 20 只(体重为 $78.21 \pm 25.68\text{g}$),按随机原则分配于 $98\text{cm} \times 82\text{cm} \times 55\text{cm}$ 的塑料箱中进行实验,每一处理组设两重复。同时,精心挑选 80 只均重为 $95.52 \pm 15.34\text{g}$ 的雄蟹在相同条件下饲养,供交配生殖实验所用。

1.2 实验饲料及饲养管理

4 种实验饲料分别为:饲料 1 为基础饲料 + V_E 、 V_C + HUFA;饲料 2,基础饲料 + V_E 、 V_C ;饲料 3,仅为基础饲料;饲料 4 为基础饲料 + HUFA;饲料 5 为鲜活河蚌。实验饲料组成见表 1,各实验饲料中 V_E 、 V_C 的实测含量见表 2,脂肪酸组成与实测含量见表 3。试验于 1999 年 9 月 - 2000 年 4 月间进行,常规饲养管理,在自然水温和光照条件下饲养 198d。各处理组中,喂以饲料 1 的雌蟹称为 1 组,其余分别为 2、3、4 和 5 组。

1.3 检测指标及检测方法

待卵巢完全发育成熟后,每处理组随机取出 3 只雌蟹,擦干体表水后准确称重,然后从雌蟹螯足第二关节处折断取血淋巴,置于 Eppendorf 管中 4 过夜,冷冻高速离心后取血清待测;取血淋巴样品的雌

蟹同时活体解剖,分别取出其肝胰腺、卵巢和肌肉,并准确称取卵巢重量,以计算性腺系数(gonadosomatic index, GSI),尽快将上述 4 种组织迅速放入 -80℃ 冰箱中保存,供测定各组织中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性及丙二醛(malonaldehyde, MDA)含量之需。SOD 活性采用黄嘌呤氧化酶法测定, SOD 活性定义为每 mL 反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量为一个亚硝酸盐单位。MDA 含量采用硫代巴比妥酸法(TBA)测定,MDA 含量高低用样品的吸光度值(A)表示。两者测定均采用南京建成生物研究所生产的试剂盒,具体操作见说明书。

表 1 四种半纯化实验饲料组成

Tab.1 Composition of the four experimental semi-purified diets

饲料不变原料 constant ingredients	配比 rate of raw material, dry weight %			
鱼粉 fish meal	35			
豆粉 soybean meal	25			
糊精 dextrin	13			
明胶 gelatin	10			
粘合剂 binder	0.5			
多维预混料 vitamin mixture ^a	3.478			
矿物质预混料 mineral mixture ^b	2			
氯化胆碱 cholin chloride	0.5			
胆固醇 cholesterol	0.5			
甘氨酸 glycine	0.5			
	实验饲料 experimental diet			
饲料可变原料 variable ingredients	1	2	3	4
鳕鱼鱼油 fish oil	6	-	6	-
卵磷脂 lecithin	3	-	3	-
维生素 E vitamin E	0.022	0.022	-	-
维生素 C vitamin C	0.5	0.5	-	-
纤维素 carboxymethylcellulose, CMC	0	9	9	9.522

注:a 为维生素预混料(不含维生素 E、C):每 100g 饲料中含维生素 K 60mg;泛酸 458mg;维生素 B6 60mg;维生素 B2 200mg;维生素 B1 600mg;生物素 120mg;烟酸 600mg;叶酸 120mg;肌醇 600mg;维生素 A 600mg;维生素 D 60mg; b 为矿物质预混料组成(%):NaH₂PO₄ 10; KH₂PO₄ 21.5; Ca(H₂PO₄)₂·2H₂O 26.5; CaCO₃ 10.5; CaC₃H₅O₃ 16.5; MgSO₄·7H₂O 10; AlCl₃·2H₂O 1.2; ZnSO₄·7H₂O 0.511; Fe₂(C₆H₅O₇)₃ 0.061; MnSO₄·4H₂O 0.143; KI 0.058; CuCl₂·0.051; CoCl₂·6H₂O 0.176; KCl 2.8

Notes: a) content of vitamin (free V_C, V_E) / 100 g diet: vitamin K 60mg; pantothenic acid 458mg; pyridoxine 60mg; riboflavin 200mg; thiamin 600mg; biotin 120mg; niacin 600mg; folic acid 120mg; inositol 600mg; vitamin A 600mg; vitamin D 60mg; b) compositions (%) of mineral mixture: NaH₂PO₄ 10; KH₂PO₄ 21.5; Ca(H₂PO₄)₂·2H₂O 26.5; CaCO₃ 10.5; CaC₃H₅O₃ 16.5; MgSO₄·7H₂O 10; AlCl₃·2H₂O 1.2; ZnSO₄·7H₂O 0.511; Fe₂(C₆H₅O₇)₃ 0.061; MnSO₄·4H₂O 0.143; KI 0.058; CuCl₂·0.051; CoCl₂·6H₂O 0.176; KCl 2.8

表 2 各组饲料中维生素 E、C 浓度

Tab.2 Vitamin E and vitamin C concentrations in experimental diets

μg·g⁻¹ dry matter

	饲料 1 diet 1	饲料 2 diet 2	饲料 3 diet 3	饲料 4 diet 4	饲料 5 diet 5
V _E	159.81 ±6.32	160.18 ±9.64	58.73 ±7.46	47.65 ±5.32	98.5 ±6.23
V _C	410.50 ±20.11	413.60 ±19.15	209.30 ±13.96	206.35 ±10.35	218.45 ±11.17

表 3 各组饲料脂肪酸组成

Tab. 3 Fatty acid composition (percentage of total fatty acids) of the experimental diets

脂肪酸 fatty acid	饲料 1 diet 1	饲料 2 diet 2	饲料 3 diet 3	饲料 4 diet 4	饲料 5 diet 5
14 0	1.0	1.0	1.2	1.1	2.6
16 0	16.4	13.2	15.1	15.8	16.7
16 1n - 7	12.8	6.1	7.8	14.2	6.3
18 0	0.3	0.5	0.3	-	1.7
18 1n - 9	1.8	0.5	0.6	1.2	9.8
18 2n - 6	5.9	13.1	12.8	6.8	7.7
18 3n - 3	12.9	10.8	11.0	17.4	12.9
20 1n - 9	15.1	20.5	19.1	14.5	4.7
20 4n - 6	2.9	3.4	3.3	3.2	3.3
20 5n - 3	11.9	4.3	4.8	10.4	12.3
22 4n - 6	1.7	4.2	1.2	0.7	1.2
22 5n - 3	1.0	1.5	-	3.1	2.1
22 6n - 3	7.4	6.0	5.1	6.7	7.7
saturates ^a	17.7	14.7	16.6	16.9	23.0
monoenes ^b	29.7	33.1	31.5	28.9	16.8
n - 3HUFA ^c	33.2	15.6	15.9	38.6	37.0
n - 6HUFA ^d	10.5	20.7	17.3	10.7	12.2
EPA + DHA	19.3	10.3	9.9	17.1	20.0

注:表中数据为同一饲料 3 次测得值的平均数; a 为 C_{14 0}, C_{16 0}, C_{18 0} 3 种脂肪酸的总量; b 为 C_{16 1n-7}, C_{18 1n-9}, C_{20 1n-9} 3 种脂肪酸的总量; c 为 C_{18 3n-3}, C_{20 5n-3}, C_{22 5n-3}, C_{22 6n-3} 3 种脂肪酸的总量; d 为 C_{18 2n-6}, C_{20 4n-6}, C_{22 4n-6} 3 种脂肪酸的总量

Notes: each value is the mean \pm s. d. of three determinations; a is the summation of C_{14 0}, C_{16 0}, C_{18 0}; b is the summation of C_{16 1n-7}, C_{18 1n-9}, C_{20 1n-9}; c is the summation of C_{18 3n-3}, C_{20 5n-3}, C_{22 5n-3}, C_{22 6n-3}; d is the summation of C_{18 2n-6}, C_{20 4n-6}, C_{22 4n-6}

1.4 雌蟹的受精与孵化

雌蟹卵巢发育成熟后,除了用于各项生化指标检测的雌蟹外,每组中剩余雌蟹均进行产卵和孵化实验。在进行孵化前,精心挑选 40 只肢全体健的雄蟹与雌蟹进行交配。具体方法是把成熟雌蟹转移到 60cm × 40cm × 38cm 的玻璃箱中,每只箱中放 2 只雌蟹和 1 只雄蟹。用人工配制的半咸水(盐度为 18 左右)饲养,诱导其交配和产卵。雌蟹抱卵后,取走雄蟹以免重复交配。各处理组中随机取 3 只抱卵蟹称重,统计其产卵数,计算出产卵力,同时将其卵收集,供分析测定卵中 V_E、V_C 和脂肪酸组成与含量。V_E、V_C 浓度分析采用高压液相色谱法(HPLC)^[8,9];脂肪酸含量分析采用高压气相色谱法(GC)^[10]。各组其余的抱卵蟹在等体积水体的玻璃箱中继续孵化,待 溞 状幼体孵出后,每处理组取 50mL(取样 3 次)水样,统计 溞 状幼体数量,据此计算出孵化率。

1.5 数据统计分析

实验所得数据采用 SPSS 系统进行方差分析,并进行多重比较。

2 实验结果

2.1 饲喂不同饲料对雌蟹生殖性能的影响

各处理组雌蟹的性腺系数、产卵力和孵化率见表 4。1 组雌蟹的性腺系数(12.38%)和产卵力(3790 个卵细胞·g⁻¹体重)最大,且孵化率最高,达 86.17%,高于 5 组雌蟹;4 组的雌蟹,虽然其性腺系数和产卵力仍较高,但卵孵化率却很低;而 2 组和 3 组的雌蟹,其性腺系数和产卵力均较低,但孵化率却均高于 4 组雌蟹。统计分析表明,在性腺系数方面,1、4 和 5 三个组的雌蟹与 2、3 两个组的雌蟹间差异极显著($P < 0.01$),而 1、4 和 5 三个组以及 2 和 3 两个组雌蟹的 GSI 差异不显著($P > 0.05$);对于产卵力来说,1

组雌蟹与 2 组、3 组雌蟹有极显著性差异 ($P < 0.01$), 而与 4 组和 5 组的雌蟹有显著性差异 ($P < 0.05$); 卵孵化率方面, 1 组雌蟹与 2 组、3 组和 4 组的雌蟹的差异极显著 ($P < 0.01$), 与 5 组的雌蟹有显著性差异 ($P < 0.05$), 其中 2 组雌蟹与 4 组雌蟹间有显著性差异 ($P < 0.05$)。

表 4 不同饲料对雌蟹性腺系数、产卵力和孵化率的影响

Tab. 4 Effect of different experimental diets on GSI, fecundity and hatchability of *E. sinensis* broodstock

饲料 diet	性腺系数 (%) GSI	产卵力 (个卵细胞/体重) fecundity	孵化率 (%) hatching rate
饲料 1 diet 1	12.38 ± 0.35 ^a	3790 ± 430 ^a	86.17 ± 3.87 ^a
饲料 2 diet 2	8.45 ± 0.25 ^b	2317 ± 50 ^c	36.06 ± 1.25 ^c
饲料 3 diet 3	8.27 ± 0.31 ^b	2129 ± 80 ^c	29.18 ± 1.18 ^d
饲料 4 diet 4	11.77 ± 0.56 ^a	3050 ± 210 ^b	25.73 ± 1.27 ^d
饲料 5 diet 5	11.51 ± 0.20 ^a	3010 ± 830 ^b	71.12 ± 5.67 ^b

注: 1. 表中的数据为每一处理组 3 个样品测定值的平均数 ± 标准差。同一列平均数值上肩标字母相同, 表示差异不显著 ($P > 0.05$), 字母不相同表示差异显著或极显著 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 2. 性腺系数 = 卵巢湿重/蟹体湿重; 产卵力 = 卵的数量 (包括受精卵和未受精卵)/蟹体湿重 ($\times 10^3$ 个卵细胞/g); 孵化率 = 溞状幼体/受精熟卵数。

Notes: 1. each value is the mean \pm s. d. of three determinations. values in the same column with same superscript are no significantly different ($P > 0.05$); values in the same column with different superscript are significantly different ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); 2. gonadosomatic index (GSI) = ((ovary wt.) $\times 100$) / (body wt.), fecundity = egg number / crab wt. $\times 10^3$ (egg cell) / g, hatching rate = zoea number (ind.) / egg number (ind.)

2.2 饲喂不同的饲料对雌蟹所产卵维生素 E、C 浓度和脂肪酸组成的影响

不同饲料对雌蟹所产卵中的 V_E 、 V_C 浓度及脂肪酸组成和含量影响的结果见表 5、表 6。饲料中 V_E 、 V_C 含量显著地影响蟹卵中 V_E 、 V_C 的浓度。饲料中 V_E 、 V_C 含量以饲料 1 和饲料 2 中的较高, 饲料 3 和饲料 4 中的较低, 卵中 V_E 、 V_C 浓度也是以喂饲料 1 和饲料 2 雌蟹所产卵的较高, 投喂饲料 3 和饲料 4 雌蟹所产卵的为低。

雌蟹卵中的脂肪酸组成和含量与饲料中脂肪酸的种类和数量密切相关, 而且蟹卵中脂肪酸含量随饲料中脂肪酸含量升高而增加。此外还发现, 5 组雌蟹所产卵中的 EPA + DHA 含量比 2 组、3 组和 4 组高, 而比 1 组低。

2.3 不同处理对雌蟹各组织中 SOD 活性和 MDA 含量的影响

表 7、表 8 分别为不同处理对雌蟹各组织中 SOD 活性和 MDA 含量影响的结果。各组织中 SOD 活性表现为 1 组、2 组比 3 组、4 组的要低得多; 而雌蟹相应组织中 MDA 含量, 也是 1 组和 2 组比 3 组和 4 组的低。此外, 各处理组雌蟹的卵巢、肝胰腺、血淋巴和肌肉等组织中 SOD 活性和 MDA 含量均表现出一定差异性, SOD 活性以卵巢和肝胰腺最低, 而 MDA 含量却是肌肉中最大。

表 5 各组雌蟹所产卵中所含维生素 E、C 的浓度

Tab. 5 V_E , V_C concentration in eggs of *E. sinensis* breeders fed on these diets

$\mu\text{g g}^{-1}$ dry matter

	卵 1 ** egg 1 **	卵 2 egg 2	卵 3 egg 3	卵 4 egg 4	卵 5 egg 5
V_E	235.2 ± 16.33 ^a	223.3 ± 18.13 ^a	93.4 ± 11.56 ^c	86.3 ± 10.54 ^c	174.1 ± 14.32 ^b
V_C	399.5 ± 21.95 ^a	392.1 ± 20.27 ^a	193.2 ± 16.87 ^c	189.4 ± 15.57 ^c	205.5 ± 16.78 ^d

注: 1. 同表 4 注 1; 2. 卵 1、卵 2、卵 3、卵 4 和卵 5 分别表示 1、2、3、4 和 5 组雌蟹所产的卵

Notes: 1. the same as note 1 of Tab. 4; 2. egg 1 is stand for the egg spawning from the female crabs in group 1, others are the same as egg 1

表6 各组雌蟹所产卵中脂肪酸组成

Tab.6 Fatty acid composition of eggs of the broodstock crabs fed different diets

脂肪酸 fatty acids	卵1 egg 1	卵2 egg 2	卵3 egg 3	卵4 egg 4	卵5 egg 5	%
14 0	1.6	1.7	1.8	1.6	3.2	
16 0	7.4	8.8	9.1	11.6	11.0	
16 1n - 7	10.2	13.2	12.6	13.1	12.1	
18 0	1.8	6.9	8.7	3.9	2.3	
18 1n - 9	0.6	1.2	2.6	2.1	1.5	
18 2n - 6	4.8	13.0	13.0	13.9	3.5	
18 3n - 3	15.6	14.1	12.8	6.9	13.8	
20 1n - 9	18.4	17.4	16.1	16.4	7.7	
20 4n - 6	5.1	4.9	5.5	3.3	2.1	
20 5n - 3	7.2	4.2	4.4	5.2	6.8	
22 4n - 6	1.5	0.8	1.5	0.7	1.7	
22 5n - 3	2.1	1.0	0.5	0.5	4.1	
22 6n - 3	16.2	8.6	8.1	12.5	14.8	
saturates	10.8	21.4	21.6	24.6	16.5	
monoenes	29.2	31.8	31.3	38.6	21.3	
n - 3HUFA	41.1	22.9	22.8	10.6	42.5	
n - 6HUFA	11.4	18.7	21.0	17.9	7.3	
EPA + DHA	23.4	12.8	12.5	17.7	21.6	

表7 不同处理组雌蟹各组织中 SOD 活性情况

Tab.7 SOD activities in different tissues of broodstock crab fed experimental diets

	饲料1 diet 1	饲料2 diet 2	饲料3 diet 3	饲料4 diet 4	饲料5 diet 5	U·mL ⁻¹
卵巢 ovary	40.09 ±9.72 ^b	39.87 ±5.87 ^b	79.21 ±5.17 ^a	85.2 ±8.17 ^a	84.83 ±10.27 ^a	
肝胰腺 hepatopancreas	45.29 ±6.54 ^b	41.78 ±4.97 ^b	80.29 ±5.91 ^a	87.37 ±5.62 ^a	82.37 ±7.86 ^a	
血淋巴 blood lymph	61.29 ±8.27 ^b	57.91 ±7.93 ^b	79.98 ±6.25 ^a	82.58 ±8.35 ^a	80.97 ±9.45 ^a	
肌肉 muscle	65.82 ±7.89 ^b	62.14 ±8.12 ^b	79.19 ±7.24 ^a	88.35 ±8.23 ^a	80.27 ±8.98 ^a	

注:同表4注1

Notes: the same as note 1 of Tab. 4

表8 不同处理组雌蟹各组织中 MDA 含量

Tab.8 MDA content in different tissues of broodstock crab fed different experimental diets

	饲料1 diet 1	饲料2 diet 2	饲料3 diet 3	饲料4 diet 4	对照组饲料 control diet	nmol·mL ⁻¹
卵巢 ovary	6.87 ±0.52 ^c	3.33 ±0.69 ^d	12.65 ±3.61 ^b	25.18 ±5.07 ^a	7.97 ±1.38 ^c	
肝胰腺 hepatopancreas	7.11 ±0.32 ^c	5.19 ±1.86 ^d	14.31 ±3.35 ^b	27.12 ±6.72 ^a	7.54 ±1.21 ^c	
血淋巴 blood lymph	8.54 ±1.63 ^c	5.42 ±1.24 ^d	15.21 ±4.23 ^b	28.67 ±2.73 ^a	9.63 ±0.81 ^c	
肌肉 muscle	9.79 ±2.50 ^b	6.53 ±1.01 ^c	38.49 ±3.82 ^a	40.87 ±6.41 ^a	11.24 ±2.32 ^b	

注:与表4注1相同

Notes: the same as note 1 of Tab. 4

3 讨论

已有研究表明, V_C 、 V_E 能调节甲壳动物体内内脏和性腺中类固醇类激素的生物合成, 从而促进亲体性腺成熟和调控胚胎发育, 提高孵化率, 改善其生殖性能, V_C 、 V_E 缺乏或不足均会影响其生殖性能^[11-13]。脂类在甲壳类生殖中有重要作用^[5], 尤其是 HUFA (如 EPA 和 DHA), 在甲壳类性腺成熟过程中不仅作为一种能量来源, 而且对于其卵黄合成和胚胎发育是必需的, 能为性腺的连续发育和胚胎发育过程中的形态发生提供必需营养成分, 如必需脂肪酸、磷脂和某些激素的前体物质等^[14-16], 可促进亲体正常性成熟, 进而促进其正常卵黄发生和胚胎发育, 提高孵化率^[3,17,18], 缺乏 EPA 和 DHA, 会降低甲壳类的生殖性能, 而甲壳类合成 EPA 和 DHA 或胆固醇的能力有限或缺乏^[19,20], 只有靠外源供应才能满足亲体性腺发育的需要^[21]。

本实验结果也证实了 V_C 、 V_E 和 HUFA 对雌蟹的生殖性能有显著的影响, 且这两类营养素有着显著的交互作用 ($P < 0.05$)。如 1 组, 雌蟹的卵巢发育很好、产卵力大、孵化率也高, 其生殖性能得到了明显地改善, 这是由于同时添加了 V_E 、 V_C 和 HUFA 这两类营养物质, 为雌蟹的性腺成熟和蟹卵的胚胎发育提供了物质基础, 从而促进了其性腺成熟, 维持胚胎正常发育, 提高孵化率, 并表现出了明显的交互作用; 2 组, 虽然饲料中添加了 V_E 、 V_C , 但因缺乏 HUFA, 雌蟹的性腺发育不良, 不仅产卵力小, 而且孵化率也较低; 4 组的雌蟹, 由于有足量的 HUFA 供亲蟹正常性成熟和卵巢发育之需, 其性腺发育尚好, 但因缺乏 V_E 、 V_C , 导致其孵化率低, 也降低了其生殖性能。若饲料中 V_C 、 V_E 和 HUFA 缺乏或不足, 会导致亲体新陈代谢受阻, 卵巢发育缓慢, 造成产卵力和孵化率等很低, 如 3 组; 而 5 组, 雌蟹性腺发育、产卵力和孵化率均达到较好水平, 但与 1 组相比均低, 表明河蟹的生殖性能还没有充分发挥, 这是由于新鲜河蚌的营养并不完善造成的, 从营养成分测定结果也可以看出, 河蚌肌肉中 V_C 、 V_E 的浓度相对较低, 而脂肪酸含量较高, 尤其是 EPA 和 DHA 含量较高, 雌蟹表现出了良好的生殖性能, 这可能与河蚌肌肉中含高的 EPA 和 DHA 有关。Cahu 等^[13] 研究印度对虾 (*Penaeus indicus*) 得出, 饲料中同时添加 V_E 、 V_C 和 HUFA 能有效地改善对虾的生殖性能; Wouters 等^[22] 研究也证实, 投喂强化 V_C 、 V_E 和 HUFA 的卤虫成体, 能促进南美白对虾 (*P. vannamei*) 性腺成熟, 提高其产卵频率。Lavens 等^[23] 研究牙鲆时指出, 生殖亲体饲料中同时添加 V_E 、 V_C 和 HUFA, 能改善卵子的质量, 提高其生殖性能。 V_E 和 V_C 对日本对虾 (*P. japonicus*) 卵巢发育的影响^[11]; 印度对虾 (*P. indicus*) 的性腺发育和卵子孵化的影响^[13] 和斑节对虾 (*P. monodon*) 性腺成熟、产卵、受精率和孵出幼体活度的影响^[24] 等。许多研究表明, 饲料脂肪酸的组成和数量与虾蟹性腺成熟、产卵频率、产卵量、卵子生化组成、孵化率和早期幼体质量及其脂肪酸组成等密切相关^[5,17,25-32]; EPA 主要与产卵量有关^[33,34], 而 DHA 主要与孵化有关^[35], 缺乏它会导致孵化率低下^[36,37]。此外, 投喂河蚌的实验结果提示我们, 在雌蟹人工配合饲料尚未研制出来之前, 投喂新鲜河蚌时应补充适量的人工饲料, 尤其是要添加足量的 V_C 、 V_E , 以充分发挥雌蟹的生殖性能。

本实验结果还表明, 生殖期雌蟹饲料中添加 V_E 、 V_C 和 HUFA, 这两类营养素能在卵巢组织和卵中积累, 促进了性腺成熟和改善了卵子质量, 进而提高雌蟹的生殖性能。已有研究表明, 卵巢和卵中必需营养成分 (V_C 、 V_E 、必需脂肪酸等) 的积累取决于亲体饲料的营养状况的^[6,13,18,22,38-40]。积累到雌蟹性腺和卵子中的 V_E 、 V_C 和 HUFA 对雌蟹的性腺成熟和胚胎发育起着极其重要的作用, 维持较高的 V_E 、 V_C 浓度和适量的 HUFA 含量, 有利于保护卵膜, 有利于卵黄发生, 维持卵细胞正常的新陈代谢, 进而促进胚胎的正常发育, 这提示我们在配制生殖期亲蟹配合饲料时, 要密切关注饲料中的 V_E 、 V_C 和 HUFA 的添加。

V_E 、 V_C 具有良好的抗氧化功能, 能够维持机体内环境的平衡, 特别是保护卵膜结构的完整性, 保护卵中 DNA 不被氧化破坏, 保护 HUFA 不被氧化酸败, 进而提高卵的孵化率, 显著改善亲体的生殖性能^[13,22,41,42]。本实验通过测定 SOD 活性和 MDA 含量, 也反映了 V_E 、 V_C 在雌蟹体内较好地发挥了抗氧化作用。投喂添加了 V_E 、 V_C 饲料的雌蟹各组织中 SOD 活性比饲喂未添加 V_E 、 V_C 饲料的雌蟹要低, 而 MDA 含量也低, 这表明 V_E 、 V_C 在河蟹体内各组织中的抗氧化作用也很显著。此外, 雌蟹各组织中 SOD

活性和MDA含量各不相同,SOD活性以肝胰腺和卵巢降幅最大,肌肉中的最小,而MDA含量却是肌肉中最大。这一结果表明, V_E 、 V_C 在雌蟹各组织中分布不均衡,在雌蟹性腺快速发育时,卵中需要较多的 V_E 、 V_C ,同时它们能在卵巢中积累,此时肝胰腺中的 V_E 、 V_C 也大量转移到卵巢中,这样就导致卵巢SOD活性较低;而作为河蟹新陈代谢中心的肝胰腺则需要较多的 V_E 、 V_C 参与调节机体的新陈代谢,且它有较强的累积能力,导致其中的SOD活性下降;而肌肉中因 V_E 、 V_C 浓度较低,尽管其SOD活性较高,脂质过氧化产物MDA含量仍较高。 V_C 、 V_E 对雌蟹生殖性能的改善,除了其作为天然抗氧化剂发挥作用,能较好地保护HUFA不被氧化,使HUFA其生理功能充分发挥外,它们还是天然的抗应激剂,能提高雌蟹对外界不良环境的抵抗力,促进雌蟹健康生长,卵巢正常发育,从而达到提高其生殖力的目的。本实验提示饲料中同时添加 V_E 、 V_C 和HUFA能更有效地改善河蟹的生殖性能。

参考文献:

- [1] Castell J D, Kean J C. Evaluation of the role of nutrition in lobster recruitment[J]. Can J Fish Aquatic Sci, 1986,43: 2320 - 2327.
- [2] Bray W A, Lawrence A L. Reproduction of *Penaeus species* in captivity[A]. Fast A W, Lester L J. Marine culture principles and practices [M]. Amsterdam, Elsevier Science Publisher B V, The Netherlands. 1992. 93 - 170.
- [3] Harrison K E. Broodstock nutrition and maturation diets[A]. D 'Abramo L R, Conklin D E, Akiyama D M, Crustacean nutrition[C]. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, . 1997, (6) :390 - 408.
- [4] Cavalli R O, Lavens P, Sorgeloos P. Performance of *Macrobrachium rosenbergii* broodstock fed diets with different fatty acid composition[J]. Aquac, 1999,179:387 - 402.
- [5] Bray W A, Lawrence A L, Lester L S. Reproduction of *Penaeus stylirostris* fed varying levels of total dietary lipid[J]. J World Aquacult. Soc. , 1990, 21: 41 - 52.
- [6] Wouters R, Lavens P, Nieto J, et al. Penaeid shrimp broodstock nutrition: an updated review on research and development[J]. Aquac, 2001, 202:1 - 21.
- [7] Xue L Z, Du N S, Lai W. Histology of female reproductive system in Chinese mitten-handed crab, *Eriocheir sinensis* (Crustacea, Decapoda) [J]. Journal of East China Normal University (Natural Science Edition), 1987, 3:88 - 97. [薛鲁征, 堵南山, 赖伟. 中华绒螯蟹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.]
- [8] Nelis H J, De Leenheer A, Merchie G, et al. Liquid chromatographic determination of vitamin C in aquatic organisms[J]. Journal of Chromatographic Science, 1997, 35: 337 - 341.
- [9] Huo J Z, Netis H J, Lavvens P, et al. Simultaneous determination of α -tocopheryl acetate and tocopherols in aquatic organism and fish feed[J]. Journal of Chromatography B, 1999,724: 249 - 255.
- [10] Christie W W. Gas Chromatography and Lipids[M]. Oily Press, Ayr. 1989.
- [11] Alava V R, Kanazawa A, Teshima S, et al. Effects of dietary vitamins A, E and C on the ovarian development of *Penaeus japonicus*[J]. Bull Jap Soc Sci Fish, 1993a, 59 (7) : 1235 - 1241.
- [12] Alava V R, Kanazawa A, Teshima S, et al. Effects of dietary L-Ascorbyl-2-phosphate magnesium on gonadal maturation of *Penaeus japonicus* [J]. Bull Jap Soc Sci Fish, 1993b,59 (4) : 691 - 696.
- [13] Cahu C L, Cuzon G, Quazuguel P. Effect of highly unsaturated fatty acids, α -tocopherol and ascorbic acid in broodstock diet on egg composition and development of *Penaeus indicus*[J]. Comp Biochem Physiol, 1995,112A(3/4) : 417 - 424.
- [14] Middleditch B S, Missler S R, Hines H B, et al. Metabolic profile of penaeid shrimp: dietary lipids and ovarian maturation[J]. Journal of Chromatography, 1980,195:359 - 368.
- [15] Millamena O M, Pascual F P. Tissue lipid content and fatty acid composition of *Penaeus monodon* fabricius broodstock from the wild[J]. J World Aquacult Soc, 1990, 21:116 - 121.
- [16] Teshima S, Kanazawa A. Variation in lipid composition during the ovarian maturation of the prawn[J]. Bull Jap Soc Sci Fish, 1983,49:957 - 962.
- [17] Harrison K E. The role of nutrition in maturation, reproduction and embryonic development of Decapod Crustaceans: a review[J]. J Shellfish Res, 1990,9: 1 - 28.
- [18] Wouters R, Molina C, Lavens P, et al. Lipid composition and vitamin content of wild female *Litopenaeus vannamei* in different stages of sexual maturation[J]. Aquaculture, 2001,198:307 - 323.
- [19] Kanazawa A. Essential phospholipids of fish and crustaceans[C]. In: Kaushik S F, Luquet P Eds, Fish Nutrition in Practice, 1993. Ed. INRA, Paris Les Colloques nr. 61, Biarritz France, 1993, 519 - 530.
- [20] Teshima S I, 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.
- [21] Castille F L, and Lawrence A L. Relationship between maturation and biochemical composition of the gonads and digestive glands of the shrimps *P. aztecus* Ives and *P. setiferus* [J]. *J Crusta Bio*, 1989, 9: 202 - 211.
- [22] Wouters R, Gomez, Lavens P, et al. Feeding enriched *Artemia* biomass to *P. vannamei* broodstock: its effect on reproductive performance and larval quality[J]. *J Shellfish Res.* 1999, 18(2): 651 - 656.
- [23] Lavens P, Lebegue E, Jaunet H, et al. Effect of dietary essential fatty acids and vitamins on egg quality in turbot broodstocks[J]. *Aquacult Int*, 1999, 7(4): 225 - 240.
- [24] Cahu C, Villette M, Quazuguel P, et al. The effect of n - 3 highly unsaturated fatty acid and vitamin E supplementation in broodstock feed on reproduction of *Penaeus indicus* [C]. In *Fish Nutrition in Practice* (Edited by Kaushik S.), Ed. INRA. Les colloques, Paris, France. 1993, 61: 589 - 598.
- [25] Wang Y W. The effect vitamin E in diets on maturity and spawn of *Penaeus monodon* [J]. *Fish World*, 1999, 23(8): 71 - 74. [王映文. 斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 的饲料中添加 V_E 对促进成熟和产卵过程的影响 [J]. *养鱼世界*, 1999, 23(8): 71 - 74.]
- [26] 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]. *Bull Jap Soc Sci Fish*, 1993, 59: 345 - 351.
- [27] Cahu C, 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]. *Aquac*, 1994, 121: 159 - 170.
- [28] Ji W J. Effect of highly unsaturated fatty acids in broodstock diets on spawning and egg quality of *Penaeus chinensis* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 1998, 22(3): 240 - 246. [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.]
- [29] 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]. *Aquac*, 1994, 119: 359 - 370.
- [30] Cavalli R O, Menschaert G, Lavens P, et al. Maturation performance, offspring quality and lipid composition of *Macrobrachium rosenbergii* female fed increasing levels of dietary phospholipids [J]. *Aquacult Int*, 2000, 8: 41 - 58.
- [31] Deroz L. Prostaglandins and related compounds from the polychaete worm *Americanuphis reesi* Fauchald as possible inducers of gonad maturation in *Penaeus* shrimp [J]. *Revista de biol, Tropical*, 1998, 36(2A): 331 - 332.
- [32] Millamena O M, Quinitio E. The effects of diets on reproductive performance of eyestalk ablated and intact mud crab *Scylla serrata* [J]. *Aquac*, 2000, 181: 81 - 90.
- [33] Mourente G, Odriozola J M. Effect of broodstock diets on lipid classes and their fatty acid composition in eggs of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L) [J]. *Fish Physiol Biochem*, 1990, 8(2): 93 - 101.
- [34] Harel M, Tandler A, Kissil G, et al. The kinetics of nutrient incorporation into body tissues of gilthead sea bream *S. aurata* females and subsequent effects on egg composition and egg quality [J]. *Br J Nutr*, 1994, 72, 45 - 58.
- [35] Watanbe T, Izquierdo M, Takeuchi J, et al. Composition between eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in term of essential fatty acid efficacy in larval red seabream [J]. *Bull Jap Soc Sci Fish*, 1989, 55: 1635 - 1640.
- [36] Kanazawa A, Miyazawa T, Hirono H, et al. Possible essentiality of docosahexaenoic acid in Japanese monkey neonates: occurrence in colostrum and low biosynthetic capacity in neonate brains [J]. *Lipids*, 1991, 26: 53 - 57.
- [37] Clarke A, Brown J H, Holmes L J. The biochemical composition of eggs from *Macrobrachium rosenbergii* in relation embryonic development [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1990, 96B: 505 - 511.
- [38] Bell J G, Famdale B M, Navas J M, et al. Effects of broodstock dietary lipid on fatty acid composition of eggs from sea bass (*Dicentrarchus labrax*) [J]. *Aquac*, 1997, 149: 107 - 119.
- [39] Blom J H, Dabrowski K. Ascorbic acid metabolism in fish: is there a maternal effect on progeny [J]. *Aquac*, 1996, 147: 215 - 224.
- [40] Samuel J M, Kannupandi T, Soundarapandian P. Nutritional effects on male reproductive performance in the freshwater prawn *Macrobrachium malcomsonii* (H. Milne Edwards) [J]. *Aquac*, 1999, 172: 327 - 333.
- [41] Waagbo R, Thorsen T, Sandnes K. Role of dietary ascorbic acid in vitellogenesis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) [J]. *Aquac*, 1989, 80: 301 - 314.
- [42] He H Q, Lawrence A. Vitamin E requirement of *Penaeus vannamei* [J]. *Aquac*, 1993, 118: 245 - 255.