

## 稻田养殖模式下克氏原螯虾幼虾的蛋白质需求量

金鸿浩<sup>1</sup>, 肖川波<sup>1</sup>, 孙倩容<sup>1</sup>, 李雨<sup>1</sup>, 孙文波<sup>1</sup>, 柯真林<sup>1</sup>, 赵绳富<sup>1</sup>,  
凌乐妍<sup>1</sup>, 高源<sup>1</sup>, 林勇<sup>2</sup>, 翟旭亮<sup>3,4</sup>, 罗莉<sup>1,3</sup>, 叶华<sup>1,3</sup>,  
罗辉<sup>1,3</sup>, 郑轲<sup>5</sup>, 王大鹏<sup>2\*</sup>, 吕光俊<sup>1,3\*</sup>

(1. 西南大学水产学院, 淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室, 重庆 402460;

2. 广西壮族自治区水产科学研究院, 广西南宁 530021;

3. 重庆市水产科技创新联盟, 重庆 400020;

4. 重庆市水产技术推广总站, 重庆 400020;

5. 江西天之佳生物科技有限公司, 江西南昌 331700)

**摘要:** 为研究在稻田养殖模式下克氏原螯虾幼虾对蛋白质的需求量, 实验设计蛋白水平分别为 28%、31%、34%、37%、40% 和 43% 的 6 组等能等脂的实验饲料 (分别记为 Diet 28~Diet 43 组), 投喂 360 尾初始体重为 (8.59±0.05) g 的克氏原螯虾幼虾, 每个处理 3 个重复。饲养 56 d 后, 测定并分析生长性能、肌肉成分、血淋巴生化指标、肠道消化酶活性以及抗氧化能力。结果显示, ① 随着饲料蛋白水平的升高, 终末体重 (FBW)、增重率 (WGR) 和特定生长率 (SGR) 先上升, 在蛋白水平达到 40% 后呈下降趋势; 出肉率 (MY) 随着蛋白水平升高而升高。② 饲料蛋白质水平对肌肉水分、粗脂肪和灰分含量无显著影响; 但随着蛋白水平的升高, 肌肉粗蛋白含量有上升的趋势。③ 饲料蛋白质水平与血淋巴谷丙转氨酶 (ALT) 和谷草转氨酶 (AST) 活性呈正相关, 且在 Diet 43 组达到最大。饲料蛋白质水平对血淋巴总蛋白 (TP)、球蛋白 (GLB)、白蛋白 (ALB)、葡萄糖 (GLU) 和总胆固醇 (T-CHO) 含量均无显著影响。但 TP 和 GLB 含量出现随着饲料蛋白质水平升高而上升的趋势。④ 饲料蛋白质水平对肠道蛋白酶 (TPS) 和脂肪酶 (LPS) 活性有显著影响, 对  $\alpha$ -淀粉酶 ( $\alpha$ -AL) 活性无显著影响。⑤ 在一定范围内提高蛋白水平可显著提高克氏原螯虾肝胰腺总超氧化物歧化酶 (T-SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、过氧化氢酶 (CAT)、过氧化物酶 (POD)、酸性磷酸酶 (ACP)、溶菌酶 (LZM) 活性以及总抗氧化能力 (T-SOD), 并且显著降低丙二醛 (MDA) 的含量。⑥ 蜕壳基因 (*ecr*、*chitinase*) 和免疫相关基因 (*hsp70*、*tlrs*、*lzm*) 表达量随饲料蛋白水平先升高后下降, 但是饲料蛋白水平并未对蛋白质代谢相关基因 (*eif4e*、*s6k1*、*4e-bp1*) 造成显著影响。研究表明, 利用增重率与饲料蛋白质水平进行折线回归分析, 在稻田养殖模式下, 克氏原螯虾幼虾获得最佳增重率时对饲料的蛋白质需要量为 40.35%, 建议稻田养殖模式下克氏原螯虾幼虾人工配合饲料中蛋白质含量以 40.35% 为宜。本研究为克氏原螯虾稻田养殖专用饲料开发提供了理论依据。

**关键词:** 克氏原螯虾; 幼虾; 蛋白质需求; 稻田养虾

中图分类号: S 966.12

文献标志码: A

收稿日期: 2023-06-27 修回日期: 2023-09-01

资助项目: 广西创新驱动发展专项 (桂科 AA20302019-6); 重庆市水产科技创新联盟项目 (CQFTIU2024-11); 重庆市生态渔产业技术体系

第一作者: 金鸿浩 (照片), 从事水产动物营养与饲料研究, E-mail: 1170801434@qq.com

通信作者: 王大鹏, 从事养殖生态学研究, E-mail: oucwdp@163.com;

吕光俊, 从事名优鱼类健康养殖研究, E-mail: lvguangjun@swu.edu.cn



适量的营养素是保证动物健康生长的必要条件, 蛋白质作为水产动物生命活动中最重要的营养素之一, 对提升水产动物生产性能和经济效益至关重要<sup>[1-2]</sup>。相关研究表明, 饲料蛋白质水平过量或不足均会影响水产动物的生长<sup>[3]</sup>。当饲料蛋白质水平不足时, 水产动物通过消耗自身肌肉组织中的蛋白质以满足其他组织和器官的正常生理功能, 从而导致生长受阻<sup>[4-5]</sup>。当饲料蛋白质水平过量时, 水产动物会将过剩蛋白质用于能量代谢, 降低了蛋白质利用率并产生氨氮, 影响养殖水环境<sup>[6-7]</sup>。因此, 准确评估水产动物的蛋白质需求量对于开发高效环保精准营养饲料和促进行业可持续发展有现实的指导意义。

克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 俗称小龙虾, 隶属十足目 (Decapoda) 螯虾科 (Cambaridae) 原螯虾属 (*Procambarus*), 原产于美国中南部和墨西哥东北部地区, 于 20 世纪 30 年代首次引入我国<sup>[8-9]</sup>。因生长速率快、适应性强、经济附加值高, 克氏原螯虾市场需求量的不断攀升带来前所未有的养殖热潮。截至 2022 年, 克氏原螯虾养殖面积达 187 万  $\text{hm}^2$ , 同比增长 7.69%; 养殖总产量达 289.07 万 t, 同比增长 9.76%<sup>[10]</sup>。

目前有关克氏原螯虾幼虾蛋白质需求量的研究主要是在封闭的人工养殖系统中进行的, 建议饲料中蛋白质含量为 20%~40%。如 Hubbard 等<sup>[11]</sup>以增重率为评价指标得到 0.9~1.2 g 的克氏原螯虾蛋白质需求为 30%。Jover 等<sup>[12]</sup>研究表明, 当克氏原螯虾 (2.1 g, 体重值, 下同) 饲料中碳水化合物和能量分别为 36%~41% 和 17~21 g/MJ 时, 蛋白质水平以 22%~26% 为宜。Miao 等<sup>[13]</sup>认为, 高蛋白饲料显著提高克氏原螯虾幼虾 [(5.17±0.32) g] 抗氧化能力和免疫能力, 并建议饲料蛋白质水平以 31% 为宜。Lu 等<sup>[14]</sup>研究发现, 饲料蛋白水平为 39.6% 时, 克氏原螯虾 [(12.86±0.10) g] 生长性能最佳, 结合性腺发育的需要, 认为饲料中蛋白水平为 35%~41% 较合适。

蛋白质作为满足水产动物生长最关键的营养物质之一, 克氏原螯虾对其需求量可能会随着生长阶段和养殖环境的变化而出现差异。截至 2022 年, 我国稻虾种养面积 157 万  $\text{hm}^2$ , 克氏原螯虾产量 240 万 t, 分别占养殖面积和总产量的 83.93% 和 83.00%<sup>[10]</sup>。我国克氏原螯虾的养殖模式以稻田养殖为主, 土塘养殖为辅。现有研究主要

是在室内养殖系统中和水泥池中完成, 缺少贴近生产实践条件下的蛋白质需求量的研究。为此, 本研究以克氏原螯虾幼虾为实验对象, 配制 6 种不同蛋白质水平的饲料, 在稻田中开展为期 56 d 的养殖实验。探究稻田养殖条件下饲料蛋白质水平对克氏原螯虾幼虾生长性能、血淋巴生化指标、消化酶活性、肌肉常规营养成分以及肝胰腺抗氧化能力和免疫能力的影响, 明确稻田养殖条件下克氏原螯虾对蛋白质的需求量, 为克氏原螯虾绿色优质饲料开发提供理论支持。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验饲料

本实验饲料以鱼粉、豆粕、花生粕、鸡肉粉、血球蛋白粉和玉米蛋白粉为主要蛋白源; 鱼油和豆油为脂肪源; 玉米淀粉为碳水化合物来源; 设置蛋白质水平分别为 28% (Diet 28)、31% (Diet 31)、34% (Diet 34)、37% (Diet 37)、40% (Diet 40) 及 43% (Diet 43) 的等能等脂饲料 (表 1)。将所用饲料原料粉碎后过 60 目筛, 经过逐级混合, 充分混匀后制成粒径为 3 mm 的颗粒饲料, 使用烘箱 60 °C 烘干 90 min 后收集于自封袋中, 置于 -20 °C 冰箱冷藏备用。

### 1.2 实验动物与饲养管理

实验虾购自重庆市荣昌区升发渔业合作社, 实验于重庆市荣昌区万宝村升发渔业合作社养殖基地稻田内开展。挑选出 360 尾初始体重为 (8.59±0.05) g 且体格健壮、附肢齐全的克氏原螯虾幼虾随机置于 18 个网箱内 (长×宽×高=1.5 m×1.5 m×1.0 m), 随机分成 6 组, 每个处理设置 3 个重复, 每个重复放养 20 尾虾, 养殖实验进行 56 d。养殖期间, 每天 7:00 和 18:00 投喂实验饲料, 投喂幼虾总重的 3%~5%, 根据摄食情况及时调整投喂量。每天对水温进行监测和记录, 每隔 2 天测定 1 次水质指标, 根据水质指标情况进行适当的调节。养殖期间水质条件保持相对稳定: 溶解氧 (DO) 大于 5 mg/L, pH 7.0~8.0, 氨氮含量小于 0.5 mg/L, 亚硝酸盐含量 < 0.01 mg/L, 以上指标均在克氏原螯虾养殖的水质指标安全范围内。样品采集过程严格按照西南大学动物管理委员会的要求执行, 并按照水产动物实验伦理审查委员会制定的规章制度执行。

表 1 实验饲料配方和常规营养成分 (风干基础)

项目 items	组别 groups						%
	Diet 28	Diet 31	Diet 34	Diet 37	Diet 40	Diet 43	
<b>原料 ingredient</b>							
鱼粉 fish meal	7.80	8.70	9.50	10.30	11.20	12.00	
花生粕 peanut meal	4.60	5.10	5.50	6.00	6.50	7.00	
豆粕 soybean meal	13.00	14.40	15.80	17.20	18.60	20.00	
血球蛋白粉 blood globulin powder	3.90	4.30	4.80	5.20	5.60	6.00	
鸡肉粉 poultry by-product meal	8.50	9.40	10.30	11.20	12.10	13.00	
玉米蛋白粉 corn gluten meal	11.10	12.30	13.50	14.60	15.80	17.00	
鱼油 fish oil	2.50	2.40	2.25	2.15	2.00	1.90	
豆油 soybean oil	2.50	2.40	2.25	2.15	2.00	1.90	
磷酸二氢钙 $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	
玉米淀粉 corn starch	33.00	28.00	23.00	18.00	13.20	8.00	
微晶纤维素 microcrystalline cellulose	5.70	5.60	5.70	5.80	5.60	5.80	
食盐 NaCl	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	
氯化胆碱 choline chloride	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	
胆固醇 cholesterol	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	
预混料 premix	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
羧甲基纤维素 carboxymethyl cellulose	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	
<b>常规营养成分(风干基础) nutrient composition (dry matter)</b>							
粗蛋白 crude protein	28.28	31.13	34.20	37.19	40.16	43.37	
粗脂肪 crude lipid	7.06	7.24	7.14	7.18	7.07	7.24	
灰分 ash	7.47	7.88	8.41	9.09	9.63	10.14	
水分 moisture	9.58	9.56	9.21	9.02	9.51	9.31	
总能量(kJ/g) gross energy	15.13	15.15	15.13	15.12	15.15	15.12	

注: 预混料每千克饲料含有维生素A 150 000 IU, 维生素D<sub>3</sub> 5 000 IU, 维生素E 3 000 mg, 维生素K<sub>3</sub> 350 mg, 维生素B<sub>1</sub> 400 mg, 维生素B<sub>2</sub> 800 mg, 维生素B<sub>6</sub> 350 mg, 维生素B<sub>12</sub> 3.5 mg, 维生素C 6 000 mg, D-泛酸钙4 000 mg, 烟酰胺3 600 mg, 叶酸300 mg, D-生物素6 mg, 肌醇3 000 mg, 一水硫酸镁4 000 mg, 一水硫酸锌2 050 mg, 一水硫酸锰650 mg, 五水硫酸铜600 mg, 一水硫酸亚铁3 000 mg, 钴110 mg, 碘100 mg, 硒30 mg。

Notes: The premix contains (per kg of diets) VA 150 000 IU, VD<sub>3</sub> 5 000 IU, VE 3 000 mg, VK<sub>3</sub> 350 mg, VB<sub>1</sub> 400 mg, VB<sub>2</sub> 800 mg, VB<sub>6</sub> 350 mg, VB<sub>12</sub> 3.5 mg, VC 6 000 mg, calcium D-pantothenate 4 000 mg, nicotinamide 3 600 mg, folic acid 300 mg, D-biotin 6 mg, inositol 3 000 mg, MgSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 4 000 mg, ZnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 2 050 mg, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 650 mg, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 600 mg, FeSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 3 000 mg, Co 110 mg, I 100 mg, Se 30 mg.

### 1.3 指标测定与分析方法

生长性能的测定 养殖 56 d 后停食 24 h, 统计每组虾的存活数量。将虾体表水分擦干后, 用电子天平 (MTS600, 深圳市美孚电子有限公司, 精确度=0.01 g) 称重 (g) 并计算:

$$\text{成活率 (SR, \%)} = N_t / N_0 \times 100\%$$

$$\text{增重率 (WGR, \%)} = (W_t - W_0) / W_0 \times 100\%$$

$$\text{特定生长率 (SGR, \% / d)} = (\ln W_t - \ln W_0) / t \times 100\%$$

$$\text{出肉率 (MY, \%)} = W_m / W_t \times 100\%$$

$$\text{肝胰腺指数 (HSI, \%)} = W_h / W_t \times 100\%$$

式中,  $N_0$  和  $N_t$  分别为实验初始和终末克氏原螯虾存活数量 (尾),  $W_0$  和  $W_t$  分别为实验初始和终末克氏原螯虾的平均体重 (g),  $t$  表示养殖天数 (d),  $W_m$  代表各组虾终末肌肉重 (g),  $W_h$  代表各组虾肝胰腺重 (g)。

血淋巴生化指标的测定 实验结束后, 每个网箱随机抽取 5 尾虾, 使用 1 mL 无菌注射器从虾的头胸甲处将血淋巴全部抽出装于 1.5 mL 离心管中, 置于 -80 °C 保存待测。

常规营养成分的测定 实验结束后, 每个网箱中随机抽取 5 尾虾, 分离腹部肌肉称重, 装入

自封袋中用于常规营养成分测定。根据 GB5009.3—2016 中 105 °C 烘干法对饲料和肌肉中的水分含量进行测定；根据 GB 5009.4—2016 中 550 °C 灼烧法对饲料和肌肉中的粗灰分含量进行测定；根据 GB5009.5—2016 以凯氏定氮法对饲料和肌肉中蛋白质含量及进行测定；根据 GB/T14772—2008 以索氏抽提法对饲料和肌肉中的粗脂肪含量进行测定。

**消化酶活性和抗氧化酶活性的测定** 实验结束后，每组随机选择 5 尾虾，分离其肠道和肝胰腺样品，分别放入标记好的离心管中，-80 °C 保存待测。肝胰腺和肠道酶液制备均按照待测指标试剂盒说明书操作。采用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒测定肠道中的脂肪酶 (LPS)、 $\alpha$ -淀粉酶 ( $\alpha$ -AL)、胰蛋白酶 (TPS) 及肝胰腺中的超氧化物歧化酶 (SOD)、总抗氧化能力 (T-AOC)、丙二醛 (MDA)、过氧化物酶 (POD)、过氧化氢酶 (CAT)、溶菌酶 (LZM)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、酸性磷酸酶 (ACP)。

**蜕壳、蛋白质代谢和免疫相关基因表达量的测定** 从每个网箱中随机挑选出 3 尾虾，使用乙醇将其体表擦拭干净，使用灭菌后的剪刀解剖，取出肝胰腺并剪出 1 cm<sup>3</sup> 的小块，置于 RNA Later 保护液中，液氮速冻后置于 -80 °C 冰箱中保存。总 RNA 的提取采用 EZ-10 DNAaway RNA Mini-Preps Kit [ 生工生物工程 (上海) 股份有限公司 ]，使用 Agilent 2100 bioanalyzer 精确检测

RNA 完整性及总量，使用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) [ 宝生物工程 (大连) 有限公司 ] 试剂盒进行逆转录反应。从 GenBank 中查找 8 个目的基因的序列，通过 Primer primer 5 引物设计软件进行引物设计 (表 2)，引物合成由北京六合华大基因科技有限公司完成。以 *gapdh* 为内参基因，每个样品的技术重复均为 3，将得到的 cDNA 按照 TB Green® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) 试剂盒，在 ABI QuantStudio 3 Real-Time PCR 系统上进行实时荧光定量 PCR 反应。反应程序：预变性 95 °C 30 s；95 °C 5 s，60 °C 34 s，40 个循环；95 °C 15 s，60 °C 1 min，95 °C 15 s，根据  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法计算目的基因的相对表达量。

#### 1.4 数据分析

实验数据用平均值±标准误 (mean±SE) 表示。利用 SPSS 26.0 软件和 Graphpad Prism 9.0 软件对实验数据进行分析 and 统计。采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 和 Duncan 氏检验进行多重比较， $P < 0.05$  表示为差异显著。

## 2 结果

### 2.1 饲料蛋白质水平对克氏原螯虾生长性能的影响

FBW、WGR 和 SGR 随着饲料蛋白质含量的增加而增加，其中以 Diet 40 组最高，但是当饲料

表 2 荧光定量引物

Tab. 2 The primers of real-time PCR

基因ID gene ID	基因名称 gene name	引物序列(5'-3') primer sequence
gene-LOC123768418	<i>gapdh</i>	F: CCCGTCACCGTCTACAA R: CACCCAGTTCCTTTTCAT
gene-LOC123767891	<i>ecr</i>	F: ATCCGCAATGGTGTTF R: GTCGCTTGTCTTGAGTG
gene-LOC123772930	<i>chitinase</i>	F: CAAACAGCAGCATCTTCC R: CGGTGGTGGTTGTGGTC
gene-LOC123757510	<i>s6k1</i>	F: CCGAGAATCGCAAGAAG R: GCCAAGCCGTTGACTAA
gene-LOC123746404	<i>4ebp1</i>	F: GCCTCCCAAGAACCTGC R: CTGGCTCCTCTGAAATCG
gene-LOC123774007	<i>EIF4e</i>	F: CGAGGAAGTTGTGGTGC R: GCCGAGGGATGTTGAGA
gene-LOC123774884	<i>hsp70</i>	F: CCACCAAGCAGACCCAG R: TCGTTCTCCCTCGTACACT
gene-LOC123748103	<i>trls</i>	F: TGCCAGTACATGGTAGA R: CTCACAGGAGTAGGAGC
gene-LOC123765035	<i>lzm</i>	F: ATCCCAACAGCCAGACC R: TTGTGAATCAGGGCGTAG

中蛋白质含量超过 40% 时, 则无显著差异 ( $P>0.05$ )。Diet 31 组 HSI 最高, 且与 Diet 40 组有显著差异 ( $P<0.05$ ), 与其他组差异不显著 ( $P>0.05$ )。各组间的 MY 和 SR 均无显著差异 ( $P>0.05$ ) (表 3)。

表 3 饲料蛋白质水平对克氏原螯虾生长性能的影响

Tab. 3 Effect of dietary protein level on growth performance of *P. clarkii*

项目 items	组别 groups					
	Diet 28	Diet 31	Diet 34	Diet 37	Diet 40	Diet 43
初始体重/g IBW	8.58±0.01	8.60±0.05	8.57±0.03	8.59±0.02	8.63±0.02	8.58±0.04
终末体重/g FBW	24.79±0.98 <sup>c</sup>	25.47±0.85 <sup>c</sup>	26.27±0.50 <sup>bc</sup>	26.63±0.86 <sup>bc</sup>	29.36±1.02 <sup>a</sup>	28.43±0.76 <sup>ab</sup>
增重率/% WGR	193.37±0.78 <sup>c</sup>	202.82±6.29 <sup>bc</sup>	209.07±4.08 <sup>bc</sup>	213.28±6.92 <sup>b</sup>	245.44±5.48 <sup>a</sup>	236.09±4.21 <sup>a</sup>
特定生长率/(%/d) SGR	1.92±0.01 <sup>c</sup>	1.98±0.04 <sup>bc</sup>	2.01±0.02 <sup>b</sup>	2.04±0.04 <sup>b</sup>	2.21±0.05 <sup>a</sup>	2.16±0.04 <sup>a</sup>
出肉率/% MY	10.05±0.12 <sup>c</sup>	10.10±0.14 <sup>bc</sup>	10.26±0.15 <sup>bc</sup>	10.03±0.14 <sup>c</sup>	11.65±0.45 <sup>ab</sup>	11.69±0.37 <sup>a</sup>
肝胰腺指数/% HSI	5.74±0.65	6.52±0.39	6.06±0.42	5.54±0.48	5.04±0.50	6.13±0.31
成活率/% SR	50.00±10.00	33.33±3.33	53.33±1.67	56.67±3.33	48.33±11.67	38.33±6.01

注: 表中同行数据肩标不同小写字母表示差异显著 ( $P<0.05$ ), 下同。

Notes: In the same row, values with different lowercase superscripts mean significant difference ( $P<0.05$ ), the same below.

以克氏原螯虾幼虾 WGR 为因变量 ( $y$ ), 饲料蛋白质水平为自变量 ( $x$ ), 通过折线模型分析得出  $y=2.379x+127.730$  ( $R^2=0.743$ ) 与  $y=-0.240x+234.670$  ( $R^2=0.803$ ) 的交点为 40.35%, 此时获得最大增重率 (图 1)。

### 2.2 饲料蛋白质水平对克氏原螯虾肌肉常规营养成分的影响

饲料中蛋白质水平对克氏原螯虾的肌肉中粗

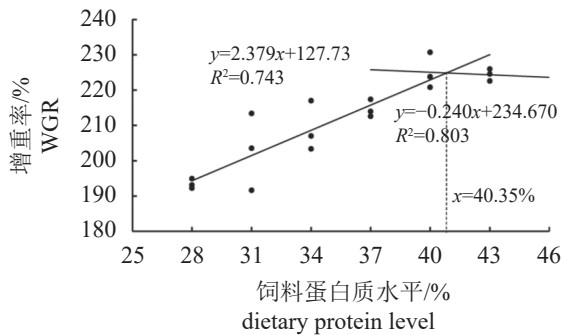


图 1 克氏原螯虾增重率与饲料蛋白质水平的折线回归分析

Fig. 1 Broken-line analysis between the WGR of *P. clarkii* and dietary protein level

脂肪、水分和灰分没有显著影响 ( $P>0.05$ ), 但是显著影响肌肉中粗蛋白的含量, 肌肉中粗蛋白随着饲料中蛋白质含量的增加而增加, 当蛋白质水平达到 40% 时为最高, 超过 40% 后没有显著差异 ( $P>0.05$ ) (表 4)。

### 2.3 饲料蛋白质水平对克氏原螯虾血淋巴生化指标的影响

饲料蛋白质水平对克氏原螯虾生长性能的影响结果显示, 饲料蛋白质水平与血淋巴 ALT 和 AST 活性呈正相关, 且在 Diet 43 组达到最大 (表 5)。血淋巴 TP 和 GLB 含量在组间无显著差异 ( $P>0.05$ ), 但出现随着饲料蛋白质水平升高而上升的趋势。饲料蛋白质水平对血淋巴 ALB、GLU 和 TCHO 含量均无显著影响 ( $P>0.05$ )。

### 2.4 饲料蛋白质水平对克氏原螯虾肠道消化酶活性的影响

在肠道中, Diet 43 组 LPS 活性最高, 且与 Diet 28 组差异显著 ( $P<0.05$ ), 与其他组均无显著差异 ( $P>0.05$ ) (图 2-a)。TPS 活性随着饲料蛋白质水平增加而升高, Diet 43 组 TPS 活性最高, 显著

表 4 饲料蛋白质水平对克氏原螯虾肌肉常规营养成分的影响

Tab. 4 Effect of dietary protein levels on the conventional nutrient composition of muscle of *P. clarkii* %

项目 items	组别 groups					
	Diet 28	Diet 31	Diet 34	Diet 37	Diet 40	Diet 43
粗蛋白 crude protein	18.15±0.54 <sup>c</sup>	18.23±0.16 <sup>c</sup>	18.29±0.47 <sup>c</sup>	19.28±0.22 <sup>b</sup>	19.55±0.05 <sup>a</sup>	19.38±0.04 <sup>ab</sup>
粗脂肪 crude lipid	1.23±0.03	1.25±0.07	1.16±0.04	1.15±0.02	1.23±0.03	1.17±0.09
水分 moisture	80.84±0.48	81.65±0.22	80.07±0.47	80.70±0.48	81.21±0.39	81.33±0.52
灰分 ash	1.54±0.01	1.53±0.01	1.53±0.01	1.52±0.01	1.54±0.02	1.54±0.01

表 5 饲料蛋白质水平对克氏原螯虾血淋巴生化指标的影响

Tab. 5 Effect of dietary protein levels on hemolymph biochemical indices of *P. clarkii*

项目 items	组别 groups					
	Diet 28	Diet 31	Diet 34	Diet 37	Diet 40	Diet 43
谷丙转氨酶/(U/L) ALT	18.00±5.57 <sup>c</sup>	19.67±4.33 <sup>bc</sup>	22.33±2.84 <sup>abc</sup>	28.67±3.48 <sup>abc</sup>	30.33±1.86 <sup>ab</sup>	34.33±2.33 <sup>a</sup>
谷草转氨酶/(U/L) AST	22.67±6.81 <sup>c</sup>	24.66±2.52 <sup>bc</sup>	26.33±4.16 <sup>bc</sup>	25.66±2.08 <sup>bc</sup>	36.33±5.86 <sup>b</sup>	48.00±6.35 <sup>a</sup>
总蛋白/(g/L) TP	13.66±2.96	14.33±1.33	15.00±1.73	16.67±1.85	17.00±3.21	19.67±0.66
白蛋白/(g/L) ALB	2.00±0.58	2.67±0.88	2.00±0.57	4.00±0.57	3.00±0.57	2.00±0.57
球蛋白/(g/L) GLB	11.66±2.85	11.66±2.18	13.00±2.08	12.67±2.33	14.00±3.46	17.67±0.67
葡萄糖/(mmol/L) GLU	1.88±0.21	1.77±0.38	1.78±0.35	1.72±0.59	1.42±0.73	1.77±0.71
总胆固醇/(mmol/L) TCHO	0.20±0.05	0.20±0.06	0.30±0.05	0.20±0.05	0.30±0.05	0.30±0.05

高于 Diet 28~Diet 37 组 ( $P<0.05$ ), 但与 Diet 40 组无显著差异 ( $P>0.05$ ) (图 2-b)。α-AL 活性在各组间没有显著差异 ( $P>0.05$ ) (图 2-c)。

### 2.5 饲料蛋白质水平对克氏原螯虾肝胰腺抗氧化酶活性的影响

在肝胰腺中, Diet 34~Diet 43 组 POD 活性显著高于 Diet 28 和 Diet 31 组 ( $P<0.05$ ), 当饲料蛋白质水平为 40% 时 POD 活性最高 (图 3-f)。Diet 43 组 CAT 活性最高, 且显著高于 Diet 28~Diet 40 组 ( $P<0.05$ ) (图 3-e)。T-SOD 活性随着蛋白质水平增加而升高, 以 Diet 43 组为最高, 且与 Diet 28~Diet 37 组存在显著差异 ( $P<0.05$ ) (图 3-a)。GSH-Px 活性随着蛋白质水平增加呈现先升高后下降的趋势, Diet 40 组 GSH-Px 活性最高, 显著高于其他组别 ( $P<0.05$ ) (图 3-c)。肝胰腺中 MDA 含量随蛋白质水平升高而降低, Diet 40 组达到最低, 仅与 Diet 43 组间没有显著差异 ( $P>0.05$ ), 但该两组 MDA 含量显著低于其他组 ( $P<0.05$ ) (图 3-d)。Diet 40 组与 Diet 43 组 LZM、ACP 活性以及 T-AOC 均显著高于 Diet 28~Diet 37 组 ( $P<0.05$ ), 但 Diet 40 组与 Diet 43 组间差异不显著 ( $P>0.05$ ) (图 3-b, g, h)。

### 2.6 饲料蛋白水平对克氏原螯虾幼虾蜕壳、蛋白质代谢和免疫相关基因表达的影响

实时荧光定量 PCR 结果显示, 饲料蛋白水平对肝脏中蜕壳相关基因 *chitinase* 和 *ecr* 有显著影响 ( $P<0.05$ ), 2 个基因表达量在一定范围内随着饲料蛋白含量升高先升高后下降 (图 4-a, b)。s6k1、4e-bp1 和 eif4e 这 3 个调控蛋白质代谢的基因在各组间无显著差异 ( $P>0.05$ ) (图 4-f, g, h)。hsp70 和 lzm 表达量均在 Diet 40 组达到最高, 前者与 Diet

28~Diet 31 组差异显著 ( $P<0.05$ ); 后者仅与 Diet 28 组存在显著差异 ( $P<0.05$ ) (图 4-c, e)。Tlrs 表达量同样在 Diet 40 组达到最高, 与 Diet 28~Diet 34 组差异显著 ( $P<0.05$ ), 与其余各组无显著差异 ( $P>0.05$ ) (图 4-d)。

## 3 讨论

目前国内外尚缺乏在主流养殖模式下对克氏原螯虾关键营养素需求量的研究, 本实验在一定程度上填补了这部分的空白。在本实验条件下, FBW、WGR、SGR 随着蛋白质水平的增加而增加, 但是当蛋白质水平达到 40% 后则无显著差异。这可能是当饲料中蛋白质水平超出克氏原螯虾生长所需时, 多余蛋白质会加重机体氮代谢负荷, 从而影响正常的生理代谢和生长<sup>[15]</sup>。通过 WGR 进行折线回归分析, 结果表明, 在稻田养殖条件下, 克氏原螯虾幼虾所需蛋白质水平为 40.35%。与此前的报道略有差异, Lu 等<sup>[14]</sup>以增长率为评价指标得到克氏原螯虾 (12 g) 蛋白需求为 39.60%, 推测主要是实验虾规格不同和养殖条件差异两方面原因导致。首先, 本研究中实验虾规格约为 8.5 g, 其生长阶段更为靠前, 蛋白需求可能会更高。其次, 本研究是在稻田水体中进行, 文献中的研究是在循环水养殖条件下进行, 本实验条件下实验虾的特定生长率远高于室内条件下, 而维持其快速生长意味着就会产生更高的营养需求, 因此不同规格和不同养殖条件下克氏原螯虾的蛋白需求可能会存在一定的差异。但红螯光壳螯虾 (*Cherax quadricarinatus*)<sup>[16]</sup>、凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)<sup>[17]</sup> 和牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)<sup>[18]</sup> 的类似实验结果没有差异。

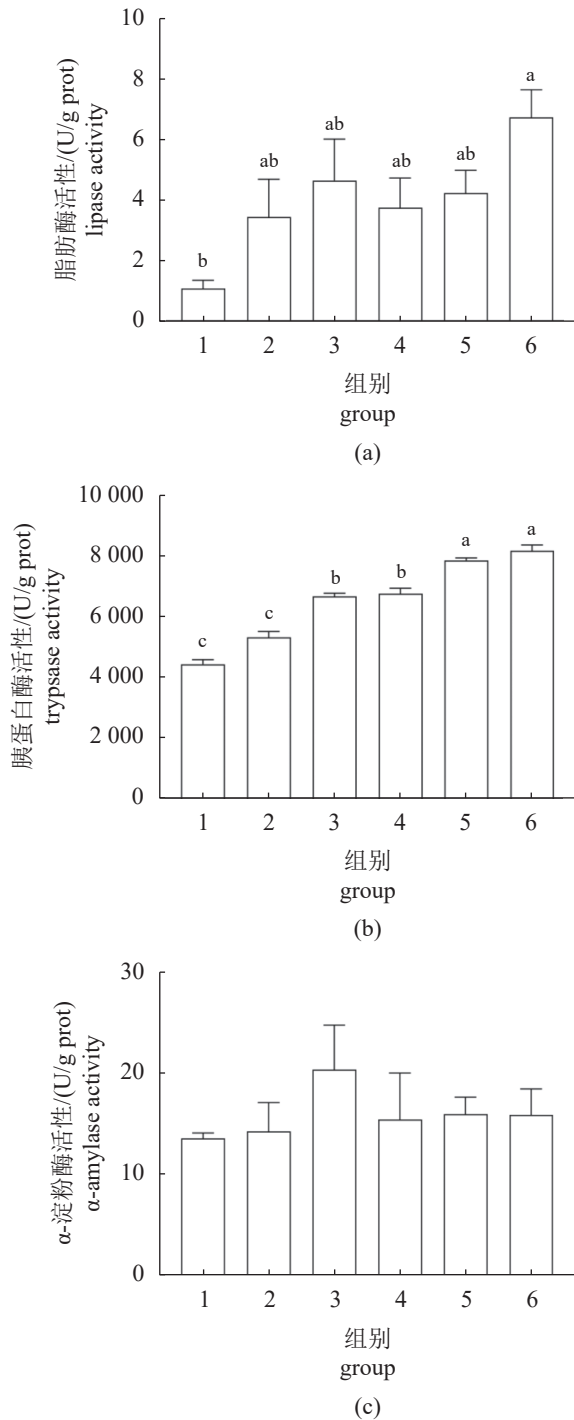


图2 饲料蛋白质水平对克氏原螯虾肠道消化酶活性的影响

1. Diet 28, 2. Diet 31, 3. Diet 34, 4. Diet 37, 5. Diet 40, 6. Diet 43; 图中误差线上标不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), 下同。

**Fig. 2 Effect of dietary protein levels on the intestinal digestive enzymes activity of *P. clarkii***

1. Diet 28, 2. Diet 31, 3. Diet 34, 4. Diet 37, 5. Diet 40, 6. Diet 43; different letter in the error line mean significant difference ( $P < 0.05$ ), the same below.

通常, 蛋白质合成和沉积的速率可能会影响水产动物的体组成<sup>[19-20]</sup>。本研究中, 饲料蛋白质

水平对克氏原螯虾肌肉中粗蛋白含量有显著影响, 在一定范围内表现为随着饲料蛋白质水平增加而增加的趋势。但是当饲料中蛋白质水平达到40%时, 肌肉粗蛋白含量最高, 之后趋于稳定。表明过量的蛋白质对于生长性能没有明显的改善作用, 在红螯光壳螯虾<sup>[21]</sup>和赤点石斑鱼 (*Epinephelus akaara*)<sup>[22]</sup>的研究中同样证实了这一点。

血生化指标一定程度上反映动物的生理代谢状态, 并与其营养状态、健康状况和环境条件密切相关<sup>[23]</sup>。ALT和AST通常被认为是反映肝脏功能的重要指标, 在本实验条件下, 二者均与饲料蛋白水平呈正相关, 表明高蛋白饲料会增加肝胰腺和心脏的负担, 这一结果与以往的研究结果一致<sup>[24]</sup>。血液中总蛋白包含白蛋白与球蛋白, 白蛋白主要功能是维持血液中血浆胶体渗透压, 而球蛋白主要参与物质运输与机体免疫反应<sup>[25]</sup>。值得注意的是, 在本实验条件下, 各组间总蛋白、白蛋白和球蛋白含量无显著差异, 但是总蛋白和球蛋白含量随饲料蛋白质水平升高而呈现上升趋势, 说明摄入蛋白质可主要提高球蛋白含量, 从而改善克氏原螯虾的免疫能力。投喂不同蛋白质水平饲料各组间血淋巴GLU含量无显著差异, 鱼类中也发现类似结果<sup>[26]</sup>, 但在虾类中鲜有报道。这可能是由于克氏原螯虾体内糖原储备充足, 糖代谢没有受到蛋白质水平影响<sup>[27]</sup>。

消化酶在营养物质消化中发挥重要作用, 其活性直接反映水生动物的消化能力、营养状况和生长性能<sup>[28-29]</sup>。本研究中饲料蛋白水平与肠道胰蛋白酶活性呈正相关, 与Guzman等<sup>[30]</sup>在白滨对虾 (*L. setiferus*) 中的研究结果基本一致, 当饲料中蛋白质含量增加, 白对虾胰蛋白酶活性随之升高<sup>[31]</sup>。另外在凡纳滨对虾的研究中同样发现, 饲料蛋白质水平与肠道蛋白酶活性存在类似的关系<sup>[32]</sup>。脂肪酶活性总体上表现出随饲料蛋白水平增加而升高的趋势, 高蛋白组与低蛋白组差异明显, 脂肪酶活性随饲料蛋白水平增加而升高的趋势, 总体上与克氏原螯虾生长趋势基本一致, 说明饲料中适宜蛋白水平可以提高肠道脂肪酶活性和脂肪的利用率以促进克氏原螯虾生长。各组间淀粉酶活性无显著差异, 与Miao等<sup>[13]</sup>对克氏原螯虾的研究结果有所不同, 主要原因可能是养殖条件和实验饲料配方的差别所致。

动物健康状况是养殖过程中不可忽视的要点, 甲壳类动物对病原体的防御主要依赖于非特异性

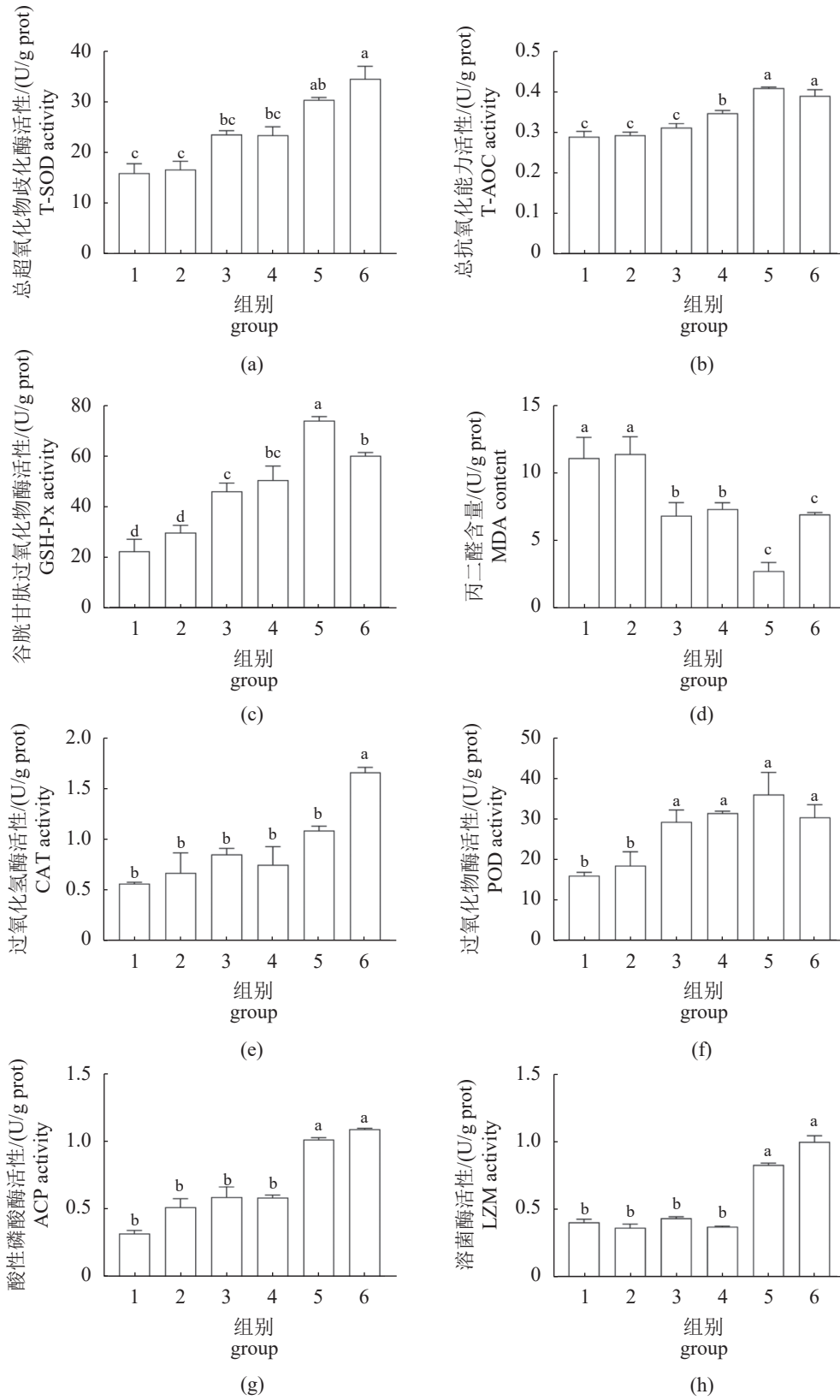


图3 饲料蛋白质水平对克氏原螯虾幼虾肝胰腺抗氧化酶和非特异性免疫酶活性的影响

Fig. 3 Effect of dietary protein levels on the hepatopancreas antioxidant enzyme and non-specific immunity enzyme activity of *P. clarkii* juvenile



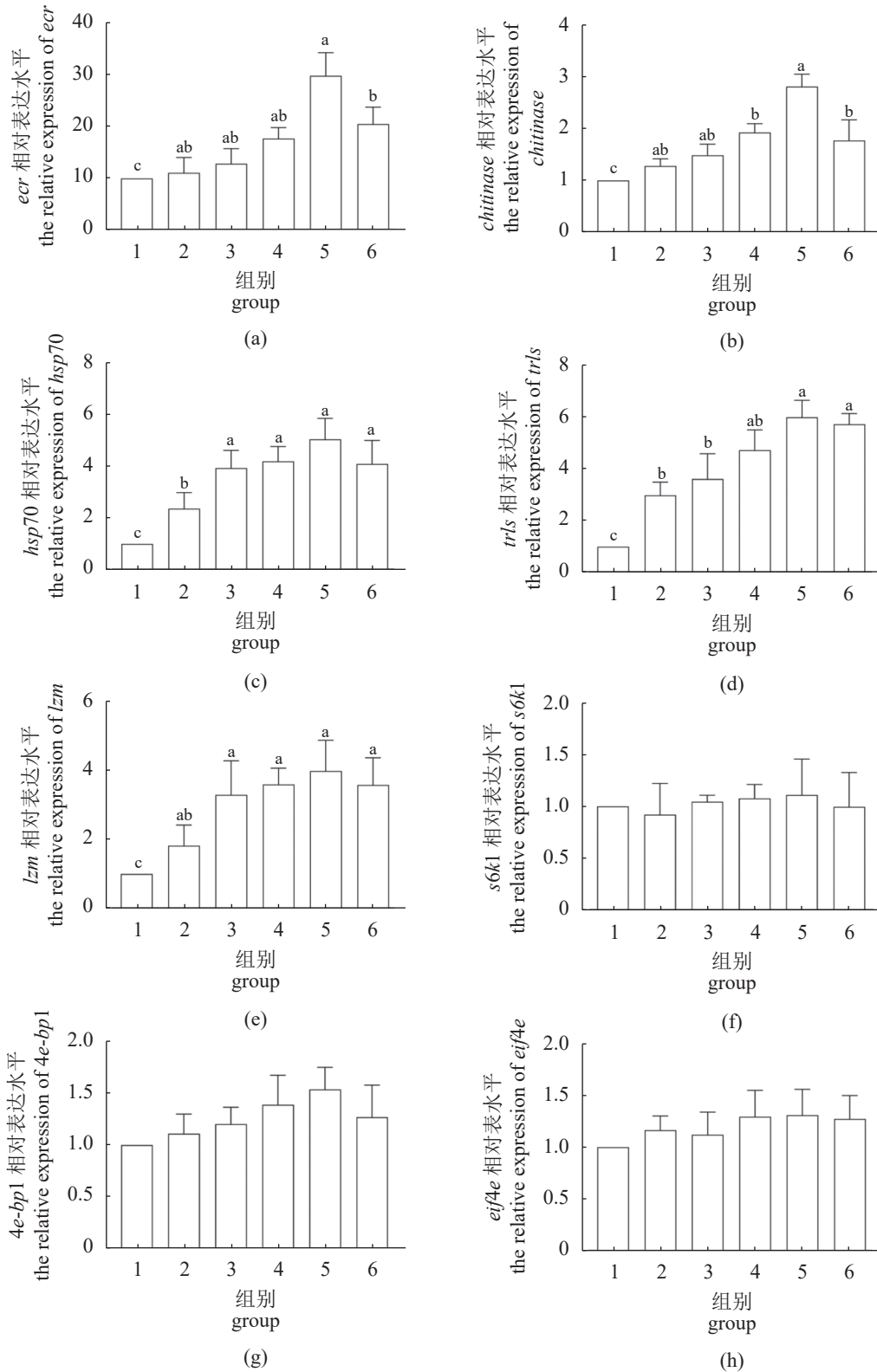


图 4 饲料蛋白质水平对克氏原螯虾幼虾蜕壳、蛋白质代谢和免疫相关基因表达的影响

Fig. 4 Effect of dietary protein levels on the genes related to molt, protein metabolism and immunity of *P. clarkii* juvenile

免疫<sup>[33]</sup>。LZM 和 ACP 普遍被认为是评估甲壳类非特异性免疫状况的重要指标, LZM 在动物体内的

活性与自身的免疫功能和健康状况休戚相关, 研究表明, 通过增加 LZM 活性可增强水生动物的免

疫力<sup>[34-35]</sup>; ACP是巨噬细胞溶酶体的标志酶,与物质代谢密切相关,在免疫反应中起重要作用,可由外源物质诱导<sup>[36]</sup>。在本研究中,不同蛋白水平饲料对克氏原螯虾肝胰腺LZM和ACP活性有显著影响,说明在一定范围内提高饲料蛋白水平可以显著提高克氏原螯虾的非特异性免疫能力。

蛋白质是合成各种免疫相关酶和抗体的必需物质,酶促和非酶促抗氧化系统是保护水生动物免受氧化损伤的第一道防线<sup>[37]</sup>。抗氧化酶和蛋白质在应对环境污染物诱导的应激和中和过量活性氧(ROS)方面发挥重要作用<sup>[38-39]</sup>。SOD系统通过将 $\cdot\text{O}^{2-}$ 转化为 $\text{H}_2\text{O}_2$ 提供了对抗氧化应激的第一道防线,从而防止了 $\cdot\text{O}^{2-}$ 对身体的直接伤害,随后有毒的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 被POD、CAT和GSH-Px进一步消除<sup>[40-41]</sup>。在本实验条件下,随着饲料蛋白质水平的升高,克氏原螯虾肝胰腺SOD和CAT活性显著升高;POD和GSH-Px活性先升高,并在Diet 40组达到最大,之后出现降低的趋势。T-AOC即总抗氧化能力变化趋势总体与上述抗氧化酶一致性较高,表明高蛋白饲料可显著提高克氏原螯虾幼虾的抗氧化能力。在尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)<sup>[41]</sup>、斜带石斑鱼(*E. coioides*)<sup>[42]</sup>和凡纳滨对虾<sup>[43]</sup>的研究中得到类似的结果。除此之外,肝胰腺中氧化产物的含量亦可反映机体抗氧化能力。MDA是细胞脂质氧化的代谢产物,其含量能反映机体氧化损伤程度和抗逆性<sup>[44]</sup>。在本研究中,MDA含量随着饲料蛋白水平呈现出逐渐降低的趋势,说明了在一定范围内高蛋白水平饲料可以减轻克氏原螯虾肝胰腺氧化损伤和提高抗逆性。同时,这也印证了上述抗氧化酶活性较高的结果。综上所述,在稻田养殖条件下,饲料蛋白水平对克氏原螯虾生长性能、抗氧化能力和免疫能力具有明显的影响,这表明生长性能与健康状况可能存在一定的内在联系。而对血淋巴生化指标和肌肉营养成分影响较小,推测这两部分对于生长性能的相关性较健康状况相关性低。

在甲壳类动物的生长过程中,蜕壳发挥主要作用。蜕壳贯穿甲壳类动物的整个生活史,与其生长、发育、繁殖和附肢再生等密切相关,甲壳类蜕皮发生的关键因素及其调控机制一直是研究的重点<sup>[45]</sup>。几丁质降解与重新合成是蜕皮过程中一个重要的生理过程,*chitinase*在这一生理过程中起到至关重要的作用<sup>[46]</sup>。*ecr*属于核受体超家族成员,在调控甲壳类动物生长发育及繁殖过程中

承担重要角色<sup>[47]</sup>。在本研究中,*ecr*和*chitinase*基因在Diet 40组中表达量均最高,这两个蜕壳过程相关的基因变化趋势与生长性能的变化趋势相一致,说明了饲料适宜蛋白水平有利于蜕壳相关基因的表达以促进克氏原螯虾幼虾生长。

蛋白质代谢涉及多个过程,受到诸多内外因素的影响。在对虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)的研究中发现,虹鳟可以通过mTOR这一重要的营养调控信号通路调节机体代谢过程以适应机体外蛋白水平的变化,导致体内多种代谢过程受到影响<sup>[48-49]</sup>。mTOR通路被激活后,会介导下游调控蛋白相关基因*ef4e*和*s6k1*的磷酸化,进而调控翻译过程。而*4e-bp1*可以与*ef4e*发生结合,对蛋白质翻译功能进行负调控<sup>[50]</sup>。本研究中*ef4e*、*s6k1*和*4e-bp1*基因mRNA表达量均无显著变化,在军曹鱼(*Rachycentron canadum*)和三倍体虹鳟研究中也得到了相似的结果<sup>[51-52]</sup>。本研究中克氏原螯虾幼虾的FBW、WGR和SGR显著增加,可能是上述蛋白质代谢相关基因对饲料蛋白水平的应答不在转录水平。

*Hsp70*、*tlrs*和*lzm*作为免疫相关的基因,在抵抗病毒和细菌等病原体方面有着非常重要的意义,对机体具有相当重要的保护作用<sup>[53-54]</sup>。本研究中的*hsp70*、*tlrs*和*lzm*基因在高蛋白组的表达量显著高于低蛋白组,这一结果与此前对抗氧化和免疫相关酶活性的测定结果相符合。说明在一定范围内提高饲料蛋白水平可以改善克氏原螯虾的免疫能力。

## 4 结论

在一定范围内提高饲料蛋白水平可以通过促进蜕壳基因(*ecr*、*chitinase*)和免疫相关基因(*hsp70*、*tlrs*、*lzm*)的表达,从而提高克氏原螯虾的生长性能和非特异性免疫能力,其消化功能和肝胰腺抗氧化能力也受到饲料蛋白水平的显著影响。但蛋白质水平过高会增加肝胰腺代谢负荷,影响其健康状况。通过对饲料蛋白水平和增重率进行折线回归分析,获得稻田养殖条件下克氏原螯虾[(8.59±0.05)g]饲料蛋白适宜需求量为40.35%。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

## 参考文献 (References):

- [1] NRC. Nutrient requirements of fish and shrimp[M]. Washington: The National Academies Press, 2011.
- [2] Sankian Z, Khosravi S, Kim Y O, *et al.* Dietary protein requirement for juvenile mandarin fish, *Siniperca scherzeri*[J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2019, 50(1): 34-41.
- [3] Xie S W, Wei D, Fang W P, *et al.* Survival and protein synthesis of post-larval white shrimp, *Litopenaeus vannamei* were affected by dietary protein level[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2020, 263: 114462.
- [4] Cai L S, Wang L, Song K, *et al.* Evaluation of protein requirement of spotted seabass (*Lateolabrax maculatus*) under two temperatures, and the liver transcriptome response to thermal stress[J]. *Aquaculture*, 2020, 516: 734615.
- [5] Singh R K, Desai A S, Chavan S L, *et al.* Effect of water temperature on dietary protein requirement, growth and body composition of Asian catfish, *Clarias batrachus* fry[J]. *Journal of Thermal Biology*, 2009, 34(1): 8-13.
- [6] Naylor M A, Kaiser H, Jones C L W. The effect of dietary protein level on total ammonia nitrogen and free ammonia nitrogen concentrations in a serial-use raceway used to farm South African abalone, *Haliotis midae* Linnaeus, 1758[J]. *Journal of Shellfish Research*, 2011, 30(2): 337-341.
- [7] Kim L O, Lee S M. Effects of the dietary protein and lipid levels on growth and body composition of bagrid catfish, *Pseudobagrus fulvidraco*[J]. *Aquaculture*, 2005, 243(1-4): 323-329.
- [8] 金鸿浩, 李雨, 李哲, 等. 克氏原螯虾营养需求与饲料研究进展 [J]. *水产科学*, 2023, 42(5): 891-900.
- Jin H H, Li Y, Li Z, *et al.* A review: research progress in nutritional requirements and feed in red swamp crayfish *Procambarus clarkii*[J]. *Fisheries Science*, 2023, 42(5): 891-900.
- [9] Chen J J, Chen C, Tan Q S. Ontogenic changes in the digestive enzyme activities and the effect of different starvation duration on the digestive enzyme activities of larval red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*)[J]. *Aquaculture Research*, 2018, 49(2): 676-683.
- [10] Jin H H, Li Y, Xiao C, *et al.* Transcriptome analysis reveals the effects of dietary protein level on growth performance and metabolism in adult *Procambarus clarkii* farming in rice field[J]. *Aquaculture Reports*, 2024, 35101949.
- [11] Hubbard D M, Robinson E H, Brown P B, *et al.* Optimum ratio of dietary protein to energy for red crayfish (*Procambarus clarkii*)[J]. *The Progressive Fish-Culturist*, 1986, 48(4): 233-237.
- [12] Jover M, Fernández-Carmona J, Del Río M C, *et al.* Effect of feeding cooked-extruded diets, containing different levels of protein, lipid and carbohydrate on growth of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*)[J]. *Aquaculture*, 1999, 178(1-2): 127-137.
- [13] Miao S Y, Han B, Li J Q, *et al.* Effects of dietary protein level on the growth performance, feed utilization and immunity of red swamp crayfish *Procambarus clarkii*[J]. *Aquaculture Reports*, 2020, 18: 100540.
- [14] Lu X, Peng D, Chen X R, *et al.* Effects of dietary protein levels on growth, muscle composition, digestive enzymes activities, hemolymph biochemical indices and ovary development of pre-adult red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*)[J]. *Aquaculture Reports*, 2020, 18: 100542.
- [15] 杨伟杰, 莫爱杰, 杨慧君, 等. 克氏原螯虾不同生长阶段饲料适宜蛋白水平的研究 [J]. *华中农业大学学报*, 2022, 41(1): 170-178.
- Yang W J, Mo A J, Yang H J, *et al.* Protein requirement of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) at three different growth stages[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2022, 41(1): 170-178 (in Chinese).
- [16] 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]. *Aquaculture Research*, 2004, 35(1): 71-79.
- [17] Shahkar E, Yun H, Park G, *et al.* Evaluation of optimum dietary protein level for juvenile whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*)[J]. *Journal of Crustacean Biology*, 2014, 34(5): 552-558.
- [18] Kim K, Wang X J, Bai S C. Reevaluation of the dietary protein requirement of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2003, 34(2): 133-139.
- [19] Abdel-tawwab M, Ahmad M H. Effect of dietary protein regime during the growing period on growth performance, feed utilization and whole-body chemical composition of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.)[J]. *Aquaculture Research*, 2009, 40(13): 1532-1537.
- [20] Smith M A K. Estimation of growth potential by measurement of tissue protein synthetic rates in feeding and fasting rainbow trout, *Salmo gairdnerii* Richardson[J]. *Journal of Fish Biology*, 1981, 19(2): 213-220.
- [21] Pavasovic A, Anderson A J, Mather P B, *et al.* Influence of dietary protein on digestive enzyme activity, growth

- and tail muscle composition in redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (von Martens)[J]. *Aquaculture Research*, 2007, 38(6): 644-652.
- [22] Wang J T, Jiang Y D, Li X Y, *et al.* Dietary protein requirement of juvenile red spotted grouper (*Epinephelus akaara*)[J]. *Aquaculture*, 2016, 450: 289-294.
- [23] Djangmah J S. The effects of feeding and starvation on copper in the blood and hepatopancreas, and on blood proteins of *Crangon vulgaris* (fabricius)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1970, 32(4): 709-731.
- [24] Zhang J Z, Zhou F, Wang L L, *et al.* Dietary protein requirement of juvenile black sea bream, *Sparus macrocephalus*[J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2010, 41(S2): 151-164.
- [25] Lermen C L, Lappe R, Crestani M, *et al.* Effect of different temperature regimes on metabolic and blood parameters of silver catfish *Rhamdia quelen*[J]. *Aquaculture*, 2004, 239(1-4): 497-507.
- [26] Ye C X, Wu Y L, Sun Z Z, *et al.* Dietary protein requirement of juvenile obscure puffer, *Takifugu obscurus*[J]. *Aquaculture Research*, 2017, 48(5): 2064-2073.
- [27] Zhou M, Wang A L, Xian J A. Variation of free amino acid and carbohydrate concentrations in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: effects of continuous cold stress[J]. *Aquaculture*, 2011, 317(1-4): 182-186.
- [28] Furné M, Hidalgo M C, López A, *et al.* Digestive enzyme activities in Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study[J]. *Aquaculture*, 2005, 250(1-2): 391-398.
- [29] Lemieux H, Blier P, Dutil J D. Do digestive enzymes set a physiological limit on growth rate and food conversion efficiency in the Atlantic cod (*Gadus morhua*)?[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1999, 20(4): 293-303.
- [30] Guzman N, Gaxiola N, Rosa N, *et al.* The effect of dietary protein and total energy content on digestive enzyme activities, growth and survival of *Litopenaeus setiferus* (Linnaeus 1767) postlarvae[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2001, 7(2): 113-122.
- [31] Giri S S, Sahoo S K, Sahu A K, *et al.* Effect of dietary protein level on growth, survival, feed utilisation and body composition of hybrid *Clarias* catfish (*Clarias batrachus* × *Clarias gariepinus*)[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2003, 104(1-4): 169-178.
- [32] Lee P G, Smith L L, Lawrence A L. Digestive proteases of *Penaeus vannamei* Boone: relationship between enzyme activity, size and diet[J]. *Aquaculture*, 1984, 42(3-4): 225-239.
- [33] Loker E S, Adema C M, Zhang S M, *et al.* Invertebrate immune systems-not homogeneous, not simple, not well understood[J]. *Immunological Reviews*, 2004, 198(1): 10-24.
- [34] Liu F, Qu Y K, Geng C, *et al.* Effects of hesperidin on the growth performance, antioxidant capacity, immune responses and disease resistance of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 99: 154-166.
- [35] Haug T, Kjøul A K, Stensvåg K, *et al.* Antibacterial activity in four marine crustacean decapods[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2002, 12(5): 371-385.
- [36] Cheng T C. Immunodeficiency diseases in marine mollusks: measurements of some variables[J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 1989, 1(3): 209-216.
- [37] Martínez-Álvarez R M, Morales A E, Sanz A. Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors[J]. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 2005, 15(1-2): 75-88.
- [38] Round J L, Mazmanian S K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2009, 9(5): 313-323.
- [39] Guo K, Ruan G L, Fan W B, *et al.* The effect of nitrite and sulfide on the antioxidant capacity and microbial composition of the intestines of red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 96: 290-296.
- [40] Mo A J, Sun J X, Wang Y H, *et al.* Apparent digestibility of protein, energy and amino acids in nine protein sources at two content levels for mandarin fish, *Siniperca chuatsi*[J]. *Aquaculture*, 2019, 499: 42-50.
- [41] Mansour A T, Esteban M Á. Effects of carbon sources and plant protein levels in a biofloc system on growth performance, and the immune and antioxidant status of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 64: 202-209.
- [42] Yan X B, Yang J J, Dong X H, *et al.* The optimal dietary protein level of large-size grouper *Epinephelus coioides*[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2020, 26(3): 705-714.
- [43] Xu W J, Pan L Q. Evaluation of dietary protein level on selected parameters of immune and antioxidant systems, and growth performance of juvenile *Litopenaeus vannamei* reared in zero-water exchange biofloc-based culture tanks[J]. *Aquaculture*, 2014, 426-427: 181-188.
- [44] Long X W, Wu X G, Zhao L, *et al.* Effects of dietary supplementation with *Haematococcus pluvialis* cell powder on coloration, ovarian development and antiox-

- idation capacity of adult female Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. *Aquaculture*, 2017, 473: 545-553.
- [45] 田灿. 饲料中添加露水草 (*Cyanotis arachnoidea*) 对克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 生长、肠道菌群、蜕皮相关基因表达的影响 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2022.
- Tian C. Effects of *Cyanotis arachnoidea* on growth, intestinal flora and molting related gene expression of *Procambarus clarkii*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2022 (in Chinese).
- [46] 李旭光, 周刚, 谷孝鸿. 水生甲壳类蜕皮发生过程及其影响因素的研究与进展 [J]. 动物学杂志, 2014, 49(2): 294-302.
- Li X G, Zhou G, Gu X H. Review of aquatic crustaceans molting and its influencing factors[J]. Chinese Journal of Zoology, 2014, 49(2): 294-302 (in Chinese).
- [47] 邱庆庆, 袁翔, 黄光华, 等. 罗氏沼虾蜕皮激素受体 *EcR* 基因的克隆及表达分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 2020, 39(5): 1999-2005.
- Qiu Q Q, Yuan X, Huang G H, et al. Cloning and expression analysis of ecdysone receptor (*EcR*) gene in *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Genomics and Applied Biology, 2020, 39(5): 1999-2005 (in Chinese).
- [48] Lansard M, Panserat S, Plagnes-Juan E, et al. Integration of insulin and amino acid signals that regulate hepatic metabolism-related gene expression in rainbow trout: role of TOR[J]. *Amino Acids*, 2010, 39(3): 801-810.
- [49] Seiliez I, Panserat S, Lansard M, et al. Dietary carbohydrate-to-protein ratio affects TOR signaling and metabolism-related gene expression in the liver and muscle of rainbow trout after a single meal[J]. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2011, 300(3): R733-R743.
- [50] Laura H, Daniel P, Julian M, et al. Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1 (EIF4EBP1) expression in glioblastoma is driven by ETS1- and MYBL2-dependent transcriptional activation[J]. *Cell Death Discovery*, 2022, 8(1): 91-91.
- [51] 骆艺文. 军曹鱼蛋白质需要量及菜籽粕、玉米蛋白粉替代鱼粉的研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.
- Luo Y W. Nutrition requirement of dietary protein and optimal replacement of fish meal protein by rapeseed meal and corn gluten meal in cobia, *Rachycentron canadum* L. [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2012 (in Chinese).
- [52] 刘小红. 饲料蛋白质水平对三倍体虹鳟生长、品质和蛋白质代谢的影响 [D]. 西宁: 青海大学, 2019.
- Liu X H. Effects of dietary protein levels on growth, quality and protein metabolism of triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[D]. Xining: Qinghai University, 2019 (in Chinese).
- [53] 杨宏鹏, 张首国, 曹莹, 等. Toll 样受体相关疾病研究进展 [J]. *科学技术与工程*, 2022, 22(35): 15427-15435.
- Yang H P, Zhang S G, Cao Y, et al. Research progress of Toll-like receptor related diseases[J]. *Science Technology and Engineering*, 2022, 22(35): 15427-15435 (in Chinese).
- [54] 周一凡, 孙存鑫, 刘波, 等. 饲料中茶树油与虾青素对克氏原螯虾生长性能、抗氧化能力及免疫相关基因表达的影响 [J]. 中国水产科学, 2022, 29(8): 1147-1159.
- Zhou Y F, Sun C X, Liu B, et al. Effect of dietary tea tree oil and astaxanthin on growth performance, antioxidant capacity, and immune-related gene expression of the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2022, 29(8): 1147-1159 (in Chinese).

## Protein requirement of *Procambarus clarkii* juvenile farming in rice field

JIN Honghao<sup>1</sup>, XIAO Chuanbo<sup>1</sup>, SUN Qianrong<sup>1</sup>, LI Yu<sup>1</sup>, SUN Wenbo<sup>1</sup>, KE Zhenlin<sup>1</sup>, ZHAO Shengfu<sup>1</sup>, LING Leyan<sup>1</sup>, GAO Yuan<sup>1</sup>, LIN Yong<sup>2</sup>, ZHAI Xuliang<sup>3,4</sup>, LUO Li<sup>1,3</sup>, YE Hua<sup>1,3</sup>, LUO Hui<sup>1,3</sup>, ZHENG Ke<sup>5</sup>, WANG Dapeng<sup>2\*</sup>, LÜ Guangjun<sup>1,3\*</sup>

(1. Key Laboratory of Freshwater Fish Reproduction and Development, Ministry of Education, College of Fisheries, Southwest University, Chongqing 402460, China;

2. Guangxi Academy of Fisheries Science, Nanning 530021, China;

3. Chongqing Aquatic Science and Technology Innovation Alliance, Chongqing 400020, China;

4. Chongqing Fisheries Technical Extension Center, Chongqing 400020, China;

5. Jiangxi Tianzhijia Biotechnology Co., Ltd., Nanchang 331700, China)

**Abstract:** As one of the most essential nutrients in life activities, protein plays a vital role in maintaining the good growth traits and health status of aquatic animals. Rice field culture is the one of the leading aquaculture pattern of *Procambarus clarkii* in China, which accounts for more than 80% of the annual production. Therefore, we should pay more attention to the protein requirements of *P. clarkii* farming in the rice field. In order to assess the optimal dietary protein requirement of juvenile *P. clarkii* farming in the rice field, six isoenergetic and isolipid diets were formulated to contain graded levels of 28%, 31%, 34%, 37%, 40% and 43% crude protein (described as Diet 28-Diet 43 group). Each diet was assigned to a triplicate of 20 experimental crayfish with an average initial body weight of (8.59±0.05) g for eight weeks. At the end of feeding trial, growth performance, muscle composition, hemolymph biochemical indexes, activities of digestive enzyme in intestine, antioxidant enzyme activities and non-specific immunity enzyme activity were measured. Our results showed that: ① The final body weight (FBW), weight gain rate (WGR) and specific growth (SGR) increased at first and then decreased. The meat yield (MY) increased with increasing protein level. ② The dietary protein levels did not significantly affect the muscle moisture, ash and lipid contents. The protein content of the muscle gradually increased as dietary protein level increasing, and then tended to decrease, and was highest in Diet 40 group. ③ The dietary protein level did not significantly affect the content of hemolymph total protein (TP), albumin (ALB), globulin (GLB), glucose (GLU), total cholesterol (TCHO) trended to decrease as dietary lipid level increased. Alanine aminotransferase (ALT) activity and aspartate aminotransferase (AST) activity in hemolymph significantly increased as dietary protein level increasing, both of them in Diet 43 group was highest. ④ The dietary protein level significantly affected the activities of intestine tryptase and lipase, but not amylase activities. ⑤ Dietary protein also significantly induced the activities of the superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px), peroxidase (POD), lysozyme (LZM), acid phosphatase (ACP) and total antioxidant capacity (T-AOC), but the contents of malondialdehyde (MDA) was significantly induced. ⑥ With dietary protein levels increasing, the expressions of molting-related genes (*ecr*, *chitinase*) and genes related immune (*hsp70*, *tlrs*, *lzm*) were firstly significantly increased and then decreased. However, dietary protein level did not significantly affect genes related to protein metabolism (*EIF4e*, *s6k1*, *4e-bp1*). Based on the WGR, broken-line analysis showed that dietary protein requirements of *P. clarkii* were 40.35% in the present study. In conclusion, under the present experimental conditions and in combination with other factors, the appropriate feed protein level was 40.35%. This study provided a theoretical basis for the development of dedicated feed for *P. clarkii* farming in the rice field.

**Key words:** *Procambarus clarkii*; juvenile; protein requirement; rice-shrimp farming

**Corresponding authors:** WANG Dapeng. E-mail: [oucwdp@163.com](mailto:oucwdp@163.com);

LÜ Guangjun. E-mail: [lvguangjun@swu.edu.cn](mailto:lvguangjun@swu.edu.cn)

**Funding projects:** Guangxi Innovation-driven Development Projects (Guike AA20302019-6); Chongqing Alliance for Aquatic Science and Technology Innovation (CQFTIU2024-11); Chongqing Ecological Fishery Industry Technology System Project