

文章编号: 1674 - 5566(2011)06 - 0853 - 05

远海梭子蟹成熟卵巢和早期胚胎的脂类成分比较研究

周 波, 吴旭干, 丰 浪, 成永旭, 杨筱珍, 刘智俊

(上海海洋大学 省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306)

摘 要: 测定和比较了远海梭子蟹 (*Portunus pelagicus*) 成熟卵巢和早期胚胎的水分、总脂、脂类组成和脂肪酸含量, 结果表明: 早期胚胎的水分含量显著大于成熟卵巢, 但后者总脂/组织湿重含量显著小于前者, 两者的总脂/组织干重并无显著差异; 甘油三酯和磷脂含量在早期胚胎与成熟卵巢之间并不存在显著差异, 但是早期胚胎中的游离脂肪酸和胆固醇含量均显著高于成熟卵巢, 这可能是胚胎发育过程中脂类物质被水解成游离脂肪酸、胆固醇和甘油等物质; 就脂肪酸组成而言, 两者中均检测出 27 种已知脂肪酸, 仅 15:0、14:1n7、20:1n7 和 18:3n3 4 种脂肪酸的含量存在显著差异 ($P < 0.05$), 16:0、18:0、16:1n7、18:1n9、20:5n3 和 22:6n3 为成熟卵巢和早期胚胎中的主要的脂肪酸种类, 其中 n3-PUFA/n6-PUFA 和 20:5n3/22:6n3 分别为 3.5 和 0.7。

研究亮点: 通过比较远海梭子蟹成熟卵巢和早期胚胎的脂类和脂肪酸组成变化, 推断远海梭子蟹成熟卵巢和早期胚胎发育的脂类营养需求, 对于开展远海梭子蟹的亲本培育和营养繁殖生理研究具有一定的理论意义和现实意义。结果显示远海梭子蟹胚胎早期发育过程中脂类物质开始被水解, 而总脂含量和脂肪酸组成并没有发生显著变化。

关键词: 远海梭子蟹; 成熟卵巢; 早期胚胎; 脂肪酸; 脂类组成

中图分类号: S 917

文献标志码: A

远海梭子蟹 (*Portunus pelagicus*) 俗称蓝花蟹, 广泛分布于太平洋和印度洋的热带及亚热带海区, 具有重要的经济价值、营养价值和生态价值^[1-3]。由于过渡捕捞和环境污染等原因, 全球远海梭子蟹的捕捞总产量已呈下降趋势^[4-5], 这显然不能满足不断增长的市场需求, 因此发展其人工育苗和养殖显得迫在眉睫。

脂类是甲壳动物成熟卵巢和胚胎中的重要组成物质, 它们不仅为胚胎发育过程提供能量, 而且是胚胎发育中器官构建和神经发育必需的营养物质^[6-8], 探明成熟卵巢和胚胎中的脂类组成对于认识甲壳动物的脂类营养繁殖学具有一定的理论意义和现实意义。但是, 迄今为止尚未见有关远海梭子蟹成熟卵巢和胚胎中脂类成分的研究报道, 因此, 测定和比较远海梭子蟹成熟卵巢和胚胎中的脂类及脂肪酸组成, 旨在为进一

步认识远海梭子蟹的繁殖生物学和脂类营养繁殖学提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料和解剖方法

成体远海梭子蟹于 2007 年 10 月至 2008 年 4 月捕自北部湾海域 (19°91'N, 109°40'E), 靠近海南岛西北部, 每次随机采样 30 ~ 50 只, 共 274 只样品。实验用蟹体重为 73.5 ~ 136.7 g, 全甲壳宽为 9.74 ~ 12.74 cm, 所采样品加冰袋后活体空运到实验室后进行称重和解剖。参考 STEWART 等^[9]的方法挑选卵巢发育成熟的个体和抱卵蟹用于实验, 取出体内的全部卵巢、肝胰腺和腹部卵块并称量, 然后据此计算卵巢指数 (gonadosomatic index, GSI) 和肝胰腺指数 (hepatosomatic index, HSI)。称重后的卵巢、肝胰

收稿日期: 2011-04-22 修回日期: 2011-05-24

基金项目: 上海市晨光计划 (2007CG64); 国家教育委员会博士点基金 (200802640002); 上海市高校创新团队项目 (D - 8006 - 10 - 209)

作者简介: 周 波 (1983—), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产动物营养繁殖学。E-mail: zbrobin@yahoo.com.cn

通讯作者: 成永旭, E-mail: yxcheng@shou.edu.cn

腺和胚胎立即保存于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中, 备用。

1.2 脂类组成分析

挑选成熟卵巢和胚胎发育处于原肠期的胚胎用于生化分析, 取 0.5 g 左右的湿样于 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下烘干测定水分含量; 将其余样品冷冻干燥后用于脂类分析, 按 FOLCH 等^[10] 方法用 $V(\text{氯仿}):V(\text{甲醇})=2:1$ 提取组织中的总脂; 根据吴旭干等^[11] 的方法用 IAROSCAN TM MK-6s 棒状薄层色谱扫描仪 (IATRON LABORATORIES INC, Tokyo, Japan) 进行脂类组成分析。具体步骤为, 将待测脂类用氯仿定容稀释至 $10\text{ mg/mL} \sim 20\text{ mg/mL}$, 取样 $1\text{ }\mu\text{L}$ 在色谱棒的零点位置进行点样, 展层液为 $V(\text{正己烷}):V(\text{乙醚}):V(\text{甲酸})=42:28:0.3$ 。展层结束后将色谱棒置于色谱棒干燥器中, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 干燥 5 min , 去除色谱棒上残留的展层液。在氢气 160 mL/min , 空气 2 L/min 的条件下用氢火焰检测器 (FID) 检测各种脂类成分, 用 Chormstar 软件处理 TLC-FID 的薄层层析图谱。磷脂 (phospholipids, PL)、胆固醇 (Cholesterol, CHO)、甘油三酰 (Triacylglycerol, TG)、游离脂肪酸 (Free fatty acids, FFA)、甘油一酰 (Monoacylglycerol, MG) 和胆固醇酯 (Cholesterol esters, CE) 的标准品购自 Sigma 公司, 用氯仿稀释后在同样的参数条件下进行层析, 以此作为脂类成分定性的依据, 脂类成分的定量采用面积百分比法。

1.3 脂肪酸分析

采用 14% 的三氟化硼-甲醇 [$V(\text{三氟化硼}):V(\text{甲醇})=14:100$] 对总脂进行甲酯化处理, 旋转蒸发到所需浓度进行脂肪酸分析^[12]。所用仪器为 Agilent-6890 气相色谱, 毛细管柱型号为 Omegawax320 ($30.0\text{ m} \times 0.32\text{ mm}$, USA), 进样口和氢火焰检测器的温度均为 $260\text{ }^{\circ}\text{C}$, 起始柱温为 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, 逐步程序升温到 $260\text{ }^{\circ}\text{C}$ 直到所有脂肪酸全部出峰。氢气的流速为 30 mL/min ; 空气流速为 300 mL/min , 补偿气体氮气的流速为 25 mL/min , 分流比为 $1:50$; 压力为 60 kPa 。混合标准脂 (Cat. No. 47085-U, 购自 Supelco 公司) 作为脂肪酸定性的依据, C19:0 作为内标用于计算脂肪酸的绝对含量 (每克干组织中含有多少毫克脂肪酸), 脂肪酸的相对含量计算采用面积百分比法。

1.4 数据处理

利用 SPSS 12.0 软件对实验数据进行统计分析, 所有数据均采用平均值 \pm 标准差表示, 采用双尾 T -test 比较成熟卵巢和胚胎中的脂类成分是否存在显著差异, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 总脂和脂类组成

表 1 为成熟卵巢和胚胎中水分和脂肪含量, 胚胎中水分含量显著高于成熟卵巢 ($P=0.011$), 成熟卵巢中总脂/组织湿重显著高于早期胚胎 ($P=0.002$), 但是两者的总脂/组织干重并没有显著差异, 均在 $26\% \sim 28\%$ 之间。就脂类组成而言, 磷脂为成熟卵巢和胚胎中的主要脂类成分, 占总脂成分的 65% 以上, 其次为甘油三酰, 约占总脂的 30% 左右, 游离脂肪酸 (FFA) 和胆固醇 (CHO) 含量较低。尽管成熟卵巢和胚胎中的甘油三酰 (TG) 和磷脂 (PL) 含量不存在显著差异, 但是胚胎中的游离脂肪酸 (FFA) 和胆固醇 (CHO) 含量显著高于成熟卵巢 (表 2)。

表 1 远海梭子蟹成熟卵巢和胚胎中水分和总脂肪含量

Tab. 1 The moisture content and total lipid in mature ovary and early embryo of *Portunus pelagicus*

指标	成熟卵巢 (n=4)	早期胚胎 (n=4)	T-test (P 值)
水分含量 / %	52.52 ± 0.24	66.73 ± 2.68	0.011
总脂/组织湿重	12.97 ± 0.51	8.75 ± 1.35	0.002
总脂/组织干重	27.31 ± 1.20	26.75 ± 2.00	0.649

表 2 远海梭子蟹成熟卵巢和胚胎中的脂类组成

Tab. 2 The lipid composition in mature ovary and early embryo of *Portunus pelagicus* %

指标	成熟卵巢 (n=4)	早期胚胎 (n=4)	T-test (P 值)
甘油三酰	29.31 ± 3.04	29.23 ± 2.07	0.968
游离脂肪酸	0	1.94 ± 1.08	0.012
胆固醇	2.87 ± 0.32	3.59 ± 0.34	0.023
磷脂	67.75 ± 2.96	65.25 ± 2.03	0.213

2.2 脂肪酸组成

远海梭子蟹成熟卵巢和胚胎中均检测出 27 种已知脂肪酸, 两种组织中绝大多数脂肪酸的含量并不存在显著差异, 仅 $15:0$ 、 $14:1n7$ 、 $20:1n7$ 和 $18:3n3$ 4 种脂肪酸的含量存在显著差异 ($P <$

0.05, 表 3)。就饱和脂肪酸而言, 16:0 的含量最高, 高达 20% 左右, 其余依次为 18:0、14:0、17:0、15:0、23:0。单不饱和脂肪酸中, 含量最高的为 16:1n7 和 18:1n9, 平均含量均为 10% 左右, 其余脂肪酸含量均在 5% 以下。多不饱和脂肪酸中, 主要为 20:4n6、20:5n3、22:6n3, 这 3 种高度不饱和脂肪酸含量分别在 3%、10%、7% 左右, 碳 18 的多不饱和脂肪酸含量均较低, 除成熟卵巢中 18:2n6 的含量为 1.08%, 其余脂肪酸的含量均小于 1.00%。整体上 n3-PUFA/n6-PUFA 和 20:5n3/22:6n3 的比值分别在 3.5 和 0.7 左右。

表 3 远海梭子蟹成熟卵巢和
胚胎中的脂肪酸组成
Tab. 3 The fatty acid composition in mature
ovary and early embryo of
Portunus pelagicus

脂肪酸	成熟卵巢 (n=4)	早期胚胎 (n=5)	T-test (P 值)	%
C14:00	3.72 ± 1.31	4.06 ± 1.31	0.708	
C15:00	0.92 ± 0.24	0.41 ± 0.19	0.010	
C16:00	18.32 ± 1.32	19.74 ± 1.69	0.214	
C17:00	1.03 ± 0.17	1.31 ± 0.31	0.156	
C18:00	6.56 ± 0.74	8.04 ± 1.88	0.186	
C23:00	0.42 ± 0.05	0.92 ± 0.55	0.115	
ΣSFA	30.98 ± 0.60	34.49 ± 4.04	0.133	
C14:1n	70.19 ± 0.14	1.03 ± 0.08	0.000	
C16:1n7	14.23 ± 2.58	11.27 ± 1.42	0.063	
C16:1n5	0.90 ± 0.53	1.11 ± 0.23	0.435	
C17:1	1.43 ± 0.43	3.59 ± 0.71	0.001	
C18:1n9	9.81 ± 2.26	9.27 ± 1.05	0.651	
C18:1n7	3.69 ± 0.97	2.45 ± 1.02	0.104	
C20:1n9	1.69 ± 0.57	1.93 ± 0.81	0.636	
C20:1n7	0.39 ± 0.17	0.97 ± 0.44	0.039	
ΣMUFA	32.32 ± 2.34	31.63 ± 2.00	0.644	
C18:2n6	1.08 ± 0.38	0.91 ± 0.24	0.438	
C18:3n4	0.37 ± 0.30	0.59 ± 0.33	0.341	
C18:3n3	0.30 ± 0.08	0.61 ± 0.14	0.005	
C18:4n3	0.40 ± 0.17	0.28 ± 0.33	0.531	
C20:2n6	0.48 ± 0.11	0.50 ± 0.29	0.935	
C20:3n6	0.20 ± 0.18	0.17 ± 0.16	0.859	
C20:3n3	0.12 ± 0.15	0.06 ± 0.04	0.514	
C20:4n6	3.76 ± 0.51	2.97 ± 0.86	0.149	
C20:4n3	0.38 ± 0.24	0.26 ± 0.12	0.352	
C20:5n3	11.24 ± 3.23	9.94 ± 1.13	0.491	
C22:2n6	0.60 ± 0.41	0.96 ± 0.65	0.368	
C22:5n3	2.01 ± 0.70	1.28 ± 0.38	0.084	
C22:6n3	7.01 ± 1.89	7.41 ± 2.03	0.771	
ΣPUFA(≥18:2n)	27.93 ± 2.90	25.93 ± 3.05	0.353	
Σn3PUFA	21.44 ± 2.84	19.84 ± 2.01	0.354	
Σn6PUFA	6.12 ± 0.52	5.50 ± 1.13	0.355	
ΣHUFA(≥20:3n)	24.71 ± 2.76	22.09 ± 2.29	0.162	
n3/n6	3.54 ± 0.68	3.69 ± 0.62	0.749	
DHA/EPA	0.69 ± 0.33	0.76 ± 0.25	0.743	
未知	8.77 ± 1.39	7.95 ± 1.32	0.393	

3 讨论

远海梭子蟹成熟卵巢和早期胚胎中的脂肪含量约占干重的 27% 左右, 这与中华绒螯蟹^[6]、锯缘青蟹^[13]和三疣梭子蟹^[14]较为接近, 明显高于凡纳滨对虾 (17.20%)^[15]、日本囊对虾 (15.08%)^[16]等海产对虾类。这是因为海产对虾类的胚胎发育时间较短, 初孵幼体为无节幼体, 而远海梭子蟹和三疣梭子蟹等经济蟹类胚胎发育时间相对较长, 胚胎中经历无节幼体、原溞状幼体和胚胎内溞状幼体阶段, 初孵幼体即为第一期溞状幼体, 因此这些种类成熟卵子和胚胎的个体较大, 脂肪含量高, 这样才能保证较长时间的胚胎发育和胚胎内幼体变态^[6-7,17]。

远海梭子蟹成熟卵巢和早期胚胎中的磷脂含量高达 65.00% 以上, 这显著高于中华绒螯蟹的 34.72% 和锯缘青蟹的 44.02%, 与挪威龙虾 (*Nephrops norvegicus*) 的成熟卵巢中的磷脂含量较为接近^[18]。胚胎中的磷脂主要用于构建组织中的膜结构^[6], 而甘油三酰等中性脂肪主要在胚胎发育过程中提供能量, 因此, 胚胎中中性脂肪含量较高的种类, 可能胚胎发育时间相对较长。远海梭子蟹早期胚胎中的游离脂肪酸和胆固醇含量显著高于成熟卵巢, 这是因为胚胎发育开始后, 胚胎开始动用卵黄物质用于器官构建, 磷脂或甘油三酰被水解成甘油二酰、游离脂肪酸等, 而胆固醇酯则被水解成胆固醇和游离脂肪酸, 故游离脂肪酸和胆固醇含量显著升高^[6]。由表 1 和 3 可知, 远海梭子蟹成熟卵巢和早期胚胎中的总脂含量和脂肪酸组成变化并不显著, 这说明胚胎早期发育过程中主要是水解甘油三酰和胆固醇酯, 并没有将脂类物质大量氧化提供能量, 故成熟卵巢和早期胚胎的脂肪含量和脂肪酸组成变化不大, 类似的现象在锯缘青蟹中也有发现^[19]。整体而言, 远海梭子蟹成熟卵巢中的脂肪酸组成与锯缘青蟹等海产梭子蟹科的种类较为接近^[13], 20:4n6、20:5n3、22:6n3 这 3 种高度不饱和脂肪酸含量均较高, 这可能与海产蟹类的食物中具有高含量的 HUFA 有关。甲壳动物卵巢和胚胎中合适 HUFA 含量及其比例不仅是胚胎正常发育的重要保证, 而且可以显著提高初孵幼体的成活率、变态率和抗逆境能力^[20-21], 进一步的研究需要确定卵巢和胚胎中 HUFA 营养对生

殖性能和幼体质量的关系,进而为确定合理的亲本投喂策略提供理论基础。

参考文献:

- [1] 戴爱云, 杨思谅, 宋玉枝, 等. 中国海洋蟹类[M]. 北京: 海洋出版社, 1986: 193-194.
- [2] WU R S S, SHIN P K S. Food segregation in three species of portunid crabs[J]. *Hydrobiologia*, 1998, 362: 107-113.
- [3] HALL D, LEE S Y, MEZIANE T. Fatty acids as trophic tracers in an experimental estuarine food chain: Tracer transfer[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2006, 336: 42-53.
- [4] 廖永岩, 李锋, 董学兴, 等. 远海梭子蟹盐度适应性初步研究[J]. *海洋通报*, 2000, 19(4): 42-48.
- [5] ROMANO N, ZENG C. Blue swimmer crabs, emerging species in Asia[J]. *Global Aquaculture Advocate*, 2008, 11(3): 34-36.
- [6] 成永旭, 堵南山, 赖伟. 中华绒螯蟹成熟卵巢的脂类及脂肪酸组成[J]. *中国水产科学*, 1999, 6(1): 79-81.
- [7] 成永旭, 堵南山, 赖伟. 中华绒螯蟹卵巢和胚胎发育期脂类物质中存在的形态及其变化[J]. *动物学杂志*, 1999, 34(1): 51-55.
- [8] ROSA R, CALADO R, NARCISO L. Embryogenesis of decapod crustaceans with different life history traits, feeding ecologies and habitats: a fatty acid approach[J]. *Marine Biology*, 2007, 151: 935-947.
- [9] STEWART M J, SOONKLANG N, STEWART P, et al. Histological studies of the ovaries of two tropical portunid crabs, *Portunus pelagicus* (L.) and *Scylla serrata* (F.) [J]. *Invertebrate Reproduction and Development*, 2007, 50(2): 85-97.
- [10] FOLCH J, LEES M, STANLEY G H S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1957, 226: 497-509.
- [11] 吴旭干, 成永旭, 唐伯平, 等. 瘤背石磺产卵前后体内的脂类和脂肪酸组成的变化[J]. *动物学报*, 2007, 53(6): 1089-1100.
- [12] MORRISON W R, SMITH L M. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethyl acetals from lipids with boron trifluoride-methanol[J]. *Journal of Lipid Research*, 1964, 5: 600-608.
- [13] ALAVA V R, QUINTIO E T, PEDRO J B, et al. Lipids and fatty acids in wild and pond-reared mud crab *Scylla serrata* (Forsskal) during ovarian maturation and spawning [J]. *Aquaculture Research*, 2007, 38, 1468-1477.
- [14] 陈石林, 吴旭干, 成永旭, 等. 三疣梭子蟹胚胎发育过程中主要生化组成的变化及其能量来源[J]. *中国水产科学*, 2007, 14(2): 229-235.
- [15] 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.
- [16] TESHIMA S, KANAZAWA A, KOSHIO S, et al. Lipid metabolism of the prawn *Penaeus japonicus* during maturation: Variation in lipid profiles of the ovary and hepatopancreas [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1989, 92(1): 45-49.
- [17] GEHRING W R. Maturation changes in the ovarian lipid spectrum of the pink shrimp *Penaeus duorarum* Burkenroad [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1974, 49A: 511-524.
- [18] ROSA R, NUNES M L. Biochemical changes during the reproductive cycle of the deep-sea decapod *Nephrops norvegicus* on the south coast of Portugal [J]. *Marine Biology*, 2002, 141: 1001-1009.
- [19] 成永旭, 李少菁, 王桂忠, 等. 锯缘青蟹胚胎发育期脂类变化的研究[J]. *海洋学报*, 2000, 22(s): 433-441.
- [20] 吴旭干, 成永旭, 南天佐, 等. 亲本营养强化对中华绒螯蟹生殖性能和苗种质量的影响[J]. *水产学报*, 2007, 31(6): 842-850.
- [21] WU X G, CHENG Y X, SUI L Y, et al. Effect of dietary supplementation of phospholipid and highly unsaturated fatty acids on reproductive performance and offspring quality of the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) broodstock [J]. *Aquaculture*, 2007, 273(4): 602-613.

A comparative study of lipid class and fatty acid composition of mature ovary and early embryo of *Portunus pelagicus*

ZHOU Bo, WU Xu-gan, FENG Lang, CHENG Yong-xu, YANG Xiao-zhen, LIU Zhi-jun

(The Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Shanghai Ocean University, Ministry of Education, Shanghai 201306, China)

Abstract: The present experiments were conducted to investigate the moisture content, lipid class and fatty acid composition in mature ovary and early embryo of *Portunus pelagicus*. The results indicated that: (1) Although the early embryo of *P. pelagicus* had higher moisture content than that of mature ovary, the higher total lipid/wet tissue could be found in the mature ovary than that of early embryo; (2) There were no significant differences in the triacylglycerol (TG) and phospholipids (PL) contents between mature ovary and early embryo, however, the early embryo had higher free fatty acids and cholesterol contents than the mature ovary. This could be explained by the hydrolyzation of TG and PL; (3) There were twenty seven identified fatty acids that could be detected in the both mature ovary and early embryo. The significant differences existed only in 15:0, 14:1n7, 20:1n7 and 18:3n3 between mature ovary and early embryo while the main fatty acids were 16:0, 18:0, 16:1n7, 18:1n9, 20:5n3 and 22:6n3 for both tissues.

Key words: *Portunus pelagicus*; mature ovary; early embryo; fatty acid; lipid class composition