

饲料中添加桑叶水提物对罗氏沼虾幼虾生长、肠道健康和免疫机能的影响

刘泽萱^{1,2}, 钟宇辉¹, 陈璐茜¹, 杨其彬³, 孙盛明^{1,2}

(1. 上海海洋大学 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306; 3. 亚热带水产研究院 海南省深远海渔业资源高效利用与加工重点实验室, 海南 三亚 572018)

摘要: 为探究饲料中添加桑叶水提物(Mulberry leaf water extract, MLWE)对罗氏沼虾幼虾生长性能、肝胰腺免疫指标、抗氧化能力及肠道健康的影响,以不添加桑叶水提物的基础饲料为对照组(MLWE0),在此基础上分别添加3 g/kg(MLWE3组)、6 g/kg(MLWE6组)、9 g/kg(MLWE9组)和12 g/kg(MLWE12组)的桑叶水提物来配置5组等氮等脂的实验饲料。选取初始体质量为(0.75±0.09)g健康活泼罗氏沼虾幼虾为研究对象,每个实验组设置3个重复,试验周期为56 d。结果显示:与对照组相比,MLWE6、MLWE9和MLWE12组特定生长率和增重率显著升高($P<0.05$),而饲料系数显著下降($P>0.05$)。与对照组相比,MLWE3、MLWE6和MLWE9组的幼虾肠道肌肉层厚度减少,肠道皱襞的高度和宽度增加。与对照组相比,各实验组中幼虾肝胰腺组织中丙二醛(Malondialdehyde, MDA)含量、超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)活力、过氧化氢酶(Catalase, CAT)活力、谷胱氨酸过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GSH-Px)活力均显著减少($P<0.05$)。MLWE6和MLWE9组幼虾肝胰腺中免疫相关基因表达量显著高于对照组($P<0.05$)。与对照组相比,MLWE6、MLWE9和MLWE12组中幼虾肠道菌群中的致病菌(如嗜水气单胞菌、霍乱弧菌)相对丰度显著降低($P<0.05$)。由此可见,在罗氏沼虾幼虾饲料中添加适宜浓度的桑叶水提物可促进罗氏沼虾幼虾生长,提高其非特异性免疫力并改善肠道健康。综合分析以及以增重率为指标,建议罗氏沼虾幼虾饲料中桑叶水提物的适宜添加水平为6~9 g/kg。

关键词: 罗氏沼虾; 桑叶水提物; 生长; 肠道健康; 免疫机能

中图分类号: S 965

文献标志码: A

罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)隶属于节肢动物门(Arthropoda)甲壳纲(Crustacea)十足目(Decapoda)长臂虾科(Palaemonidae)沼虾属(*Macrobrachium*)。罗氏沼虾素有淡水虾王之称,它具有食性广泛、肉质营养丰富、养殖周期短等优势^[1]。罗氏沼虾是全球最具经济价值的淡水养殖虾类之一,在中国和其他东南亚国家已被广泛养殖^[2],据统计,2023年中国罗氏沼虾养殖产量近18万t。近年来,随着养殖规模的不断扩大,罗氏沼虾病害频发,给养殖户造成巨大损失。鉴于水产养殖中大量使用抗生素会给水产品质量安

全带来负面影响,采用营养调控手段预防疾病暴发无疑是绿色病害防控措施之一,饲料组成不仅影响着水产动物的生长繁殖,同时也会影响水产动物的免疫机能与抗病能力^[3]。国内已有学者尝试筛选适宜罗氏沼虾的饲料添加剂,期望增强罗氏沼虾机体免疫力,从而实现预防疾病暴发的目的^[4-5]。肠道是虾类消化和吸收营养物质的主要场所,肠道健康是保障虾类正常生长繁育的重要因素,筛选可以改善罗氏沼虾肠道健康的饲料添加剂是当前促进罗氏沼虾养殖业健康、持续发展的关键所在。

收稿日期: 2024-09-10

修回日期: 2024-10-05

基金项目: 国家重点研发项目战略性科技创新合作专项(2023YFE0205100); 上海市教委东方学者特聘教授项目(TP2022078); 上海市科技创新行动计划(23XD1421600, 22015820700); 宁夏回族自治区重点研发计划(2022ZDYF0569); 海南省重点研发计划(ZDYF2024XDNY163)

作者简介: 刘泽萱(1999—),女,硕士研究生,研究方向为甲壳动物生理学。E-mail: 18841515510@139.com

通信作者: 孙盛明, E-mail: sunshengming621416@163.com

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

桑叶(*Morus alba* L.),是桑科植物桑的叶子,又被称为家桑、黄桑叶等,是中国种植历史悠久、具有多种药效价值的草药原料^[6]。其主要的功能成分包括桑叶提取物、桑叶黄酮、桑叶多糖和生物碱等,具有降糖^[7]、抗氧化^[8]、抗菌抗炎^[9]等活性。桑叶水提物(Mulberry leaf water extract, MLWE)作为新型的饲料添加剂具有非常广阔的应用前景。研究表明,饲料中添加桑叶水提物能够明显改善畜禽免疫机能,例如CHENG等^[10]研究发现,0.4 g/kg MLWE可显著增强雏鸡(*Gallus domesticus*)的生长性能,提高肠道中益生菌的丰度,增强免疫调节和抗氧化能力,ZHAO等^[11]的研究表明添加0.6 g/kg的桑叶提取物可以改善仔猪(*Sus scrofa*)的肠道健康,明显降低其腹泻的发病率。近年来,关于在鱼类饲料中添加桑叶提取物的研究已有大量报道,例如杨继华等^[12]证实饲料中添加桑叶提取物能够提升吉富罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)的生长性能、血清和肝脏的抗氧化指标;又如已有学者报道饲料中添加桑叶提取物改善了大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)、团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)和金鲳(*Trachinotus ovatus*)的免疫机能和抗氧化能力^[13-15]。此外,周东来等^[16]研究发现饲料中添加桑叶提取物可以改善鳊(*Siniperca chuatsi*)肠道健康,相比之下桑叶提取物在虾类饲料中添加的研究较少,仅见饲料中添加桑叶黄酮对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)生长性能和肠道健康影响的报道^[17-18],但未见饲料中添加桑叶提取物对罗氏沼虾生长、肠道健康和免疫机能影响的详细报道。

本试验旨在探究罗氏沼虾配合饲料中桑叶水提物的适宜添加量,评估饲料中添加桑叶水提物对罗氏沼虾幼虾生长性能、肠道健康及免疫机能的影响,为桑叶水提物在罗氏沼虾幼虾配合饲料中的合理应用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 桑叶水提物的提取工艺

将采摘的新鲜桑叶洗净晒干后粉碎,过60目(孔径0.25 mm)筛网得到桑叶粉,按照周东来等^[16]报道进行预处理,称取一定量预处理过的桑叶粉,利用75%乙醇溶液,40℃超声辅助进行反复回流提取,每次提取进行25 min,重复上述步骤3次,将过滤液进行减压浓缩和冷冻干燥,得到桑叶水提物粉末(其中,桑叶提取物含量为388.98 mg/g;桑

叶黄酮含量为48.55 mg/g),4℃冰箱保存用于饲料制作。

1.2 实验饲料

以进口鱼粉、豆粕和菜粕作为主要的蛋白源,以豆油、鱼油和大豆卵磷脂作为主要的脂肪源,配置罗氏沼虾基础实验饲料,在基础饲料中添加0 g/kg (MLWE 0)、3 g/kg (MLWE3组)、6 g/kg (MLWE6组)、9 g/kg (MLWE9组)和12 g/kg (MLWE12组)的桑叶水提物,制成5种等氮等脂的罗氏沼虾配合饲料(表1)。在饲料的具体制备过程中,首先是使用多级流水式中药粉碎机将饲料原料进行粉碎,统一过60目筛;其次,完成精准称量并将所有原材料逐级充分混匀后制成直径1.5 mm的硬颗粒饲料,自然风干后放入密封袋中,置于-20℃冰箱中保存备用。

1.3 养殖管理

试验用罗氏沼虾幼虾购自海南汇鑫苗种有限公司,试验用虾在中国水产科学研究院南海水产研究所养殖车间暂养14 d,使其适应养殖环境。在暂养期间,以不含有桑叶水提物添加的基础饲料进行投喂,并于实验开始前停止进食24 h。挑选大小均匀、健康活泼、初始体质量为 (0.75 ± 0.09) g的罗氏沼虾幼虾300尾,将其分成5个实验组分别饲喂基础饲料和4种实验饲料,每组设置3个重复,每个重复20尾幼虾,共计15个循环水养殖玻璃缸。实验周期为56 d,实验期间,投喂1 h后清除缸底部残留的饲料和粪便,保持氨氮 <0.2 mg/L,亚硝氮 <0.05 mg/L,溶解氧 >6.5 mg/L,水温27~29℃,pH为7.7~8.2,采用自然光照。试验期间每天投喂饲料3次(08:00、13:00和18:00),投喂量为罗氏沼虾幼虾体质量的6%~8%。

1.4 样品采集

采样前对罗氏沼虾禁食24 h,以每个重复的养殖玻璃缸为统计单位进行称重计量。从每个组中随机选取6尾虾,在无菌解剖盘上分离其肠道组织,置于2 mL冻存管中,其中3只虾肠道组织分别用2.5%的戊二醛溶液和4%的多聚甲醛溶液固定后用于电镜和光镜检测,另外3只虾的肠道装入5 mL无菌离心管中,置于液氮中速冻后于-80℃保存,用于肠道微生物16S rDNA测序。从每组中随机选取3尾虾,在无菌解剖盘上分离其肝胰腺组织,置于2 mL冻存管中,-80℃冰箱保存用于免疫基因表达与抗氧化指标检测。

表 1 试验饲料组成及营养水平(风干基础)
Tab. 1 Composition and nutrient levels of experimental diets (air-dry basis)

原料 Ingredients	组别 Groups				
	MLWE0	MLWE3	MLWE 6	MLWE9	MLWE12
进口鱼粉 Imported fish meal	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00
小麦面粉 Wheat flour	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00
豆粕 Soybean meal	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00
菜籽粕 Rapeseed meal	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
磷虾粉 Krill meal	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
微晶纤维素 Microcrystalline cellulose	5.00	4.70	4.40	4.10	3.80
豆油 Soybean oil	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
鱼油 Fish oil	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
大豆卵磷脂 Soybean lecithin	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
胆固醇 Cholesterol	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
脱壳素 Molting hormone	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
氯化胆碱 Choline chloride	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
维生素预混料 Vitamin premix ¹	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
矿物预混料 Mineral premix ²	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
磷酸二氢钙 Ca(H ₂ PO ₄) ₂	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
黏结剂 Binder	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
桑叶水提物 Mulberry leaf water extract		0.30	0.60	0.90	1.20
营养水平 Nutrient levels					
粗蛋白质 Crude protein	39.36	39.21	39.88	39.42	39.17
粗脂肪 Crude lipid	7.83	7.85	7.66	7.54	7.93
水分 Moisture	11.65	11.25	11.88	11.51	11.08
粗灰分 Crude ash	10.42	10.44	10.50	10.32	10.36

注:1. 维生素预混料为每千克饲料提供: VA 1.5 g, VB₁ 1.3 g, VB₂ 2.0 g, VB₆ 2.4 g, VB₁₂ 0.8 g, VC 40.0 g, VD₃ 0.5 g, VK₃ 3.5 g, 烟酰胺 3.6 g, D-泛酸钙 3.3 g, 叶酸 0.4 g, D-生物素 0.8 g, 肌醇 12.5 g。2. 矿物质预混料为每千克饲料提供: CuSO₄·5H₂O 10 g, FeSO₄·7H₂O 66.7 g, MnSO₄·4H₂O 9.4 g, ZnSO₄·7H₂O 34.8 g, MgSO₄·7H₂O 150 g, KCl 23.6 g, Na₂SeO₃ 4.5 g, CaH₄I₂O₆ 6.5 g, CoSO₄·7H₂O 1.7 g, 沸石粉 352.8 g。

Notes: 1. Vitamin premix provided the following per kg of diets: VA 1.5 g, VB₁ 1.3 g, VB₂ 2.0 g, VB₆ 2.4 g, VB₁₂ 0.8 g, VC 40.0 g, VD₃ 0.5 g, VK₃ 3.5 g, nicotinamide 3.6 g, D-calcium pantothenate 3.3 g, folic acid 0.4 g, D-biotin 0.8 g, inositol 12.5 g. 2. Mineral premix provided the following per kg of diets: CuSO₄·5H₂O 10 g, FeSO₄·7H₂O 66.7 g, MnSO₄·4H₂O 9.4 g, ZnSO₄·7H₂O 34.8 g, MgSO₄·7H₂O 150 g, KCl 23.6 g, Na₂SeO₃ 4.5 g, CaH₄I₂O₆ 6.5 g, CoSO₄·7H₂O 1.7 g, zeolite powder 352.8 g.

1.5 指标测定

1.5.1 生长指标测定

根据幼虾体质量和摄食饲料量等指标,计算幼虾生长性能和饲料利用能力。增重率(Weight gain rate, WGR)、特定生长率(Specific growth rate, SGR)、饲料系数(Feed conversion ratio, FCR)、存活率(Survival rate, SR)按下列公式计算:

$$R_{SG}=(\ln W_t - \ln W_0)/t \times 100\% \quad (1)$$

$$R_{WG}=(W_t - W_0)/W_0 \times 100\% \quad (2)$$

$$R_{FC}=(T - S)/(W_t - W_0) \times 100\% \quad (3)$$

式中: R_{SG} 为特定生长率,%; R_{WG} 为增重率,%; R_{FC} 为饲料系数; W_0 、 W_t 分别为实验幼虾初始体质量和终末体质量, g; T 、 S 分别为总饲料量和剩余饲

料量; t 为实验天数, d。

1.5.2 生理生化指标测定

采用分析化学家协会(Association of official analytical chemists, AOAC)的标准程序对饲料原料、饲料成品和罗氏沼虾幼虾肌肉成分的营养水平进行测定。测定时,将待测样品破碎研磨成粉状,置于 105 °C 烘箱中烘干 48 h,再称重以计算水分含量,使用凯氏定氮法测定粗蛋白质含量(GB 5009.5—2016),采用索氏抽提法测定粗脂肪含量(GB/T 6433—2006),粗灰分含量则采用马弗炉煅烧法进行测定。取 0.20 g 肝胰腺组织放于匀浆管中,加入 9 倍体积的生理盐水,在冰浴条件下 4 000 r/min 匀浆 2 min, 4 °C 3 500 r/min 离心 15 min,取上清液。肝胰腺总蛋白(Total protein,

TP)、丙二醛(Malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GSH-Px)测定均使用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒,具体测定方法参照试剂盒说明书。

1.5.3 肠道组织结构分析

固定好的肠道样品经乙醇梯度脱水,二甲苯透明,处理好的组织按常规石蜡包埋组织的制备流程进行制备,制成4 μm 的石蜡切片。切片再经脱水、透明、封固,使用荧光显微镜(Nikon Eclipse Ci-L, H550S)观察拍照^[19]。固定好的肠道样品经过磷酸缓冲液漂洗3次后置于1.5 mL离心管中,采用2.5%的戊二醛溶液固定。磷酸缓冲液漂洗3次后,使用1%的锇酸溶液固定样品2 h,经过乙醇梯度脱水和纯丙酮处理20 min,最后用Epon 812树脂进行包埋。组织样品在LEICA EM UC7型超薄切片机中进行切片,切片厚度为70~90 nm,切片经柠檬酸铅溶液和醋酸双氧铀50%乙醇饱和溶液各染色5~10 min,最终使用透射电镜(JEM-

1400Flash)进行观察和拍照^[19]。

1.5.4 荧光定量PCR分析

使用Trizol法提取罗氏沼虾幼虾肝胰腺组织中的总RNA, RNA的质量和纯度测定分别采用1%琼脂糖凝胶电泳和分光光度法,将提取质量较好的RNA使用Hifair® III 1st Strand cDNA Synthesis Kit逆转录试剂盒进行反转录。采用荧光定量PCR技术检测摄食添加不同浓度桑叶水提物的罗氏沼虾幼虾肝胰腺组织中的免疫基因表达水平。根据Hieff UNICON® Universal Blue qPCR SYBR Green Master Mix试剂盒说明书的要求,配置反应体系,并在QuantStudio™ 3 Real-Time PCR Instrument执行实时定量PCR反应, β -actin基因作为内参。用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析荧光定量实验数据,通过计算试验组与对照组之间的循环阈值(Cycle threshold, CT)差异来评估基因表达水平,测量数据均以平均值 \pm 标准误(Mean \pm SE)表示。使用Graphpad prism软件进行数据可视化。表2展示了本试验使用的引物序列,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表2 本试验所用的引物序列
Tab. 2 Sequence of primers adopted in present study

引物 Primer	正向引物 Forward primer(5'-3')	反向引物 Reverse primer(5'-3')
<i>Toll</i>	TTCGTGACTTGTGCGCTCTC	GCAGTTGTTGAAGGCATCGG
<i>Imd</i>	CCACTCCGACCACATTCTCC	ATTGAAGACGGCGCCTATGT
<i>Relish</i>	CTCCTTCAGCCAGACAAT	CTCAACAACCGTACCCTAA
<i>ALF1</i>	GGAAGGCAGACATTGGACC	GCAGACGCAGAAGGAAGG
<i>ALF3</i>	GAAAGCCTTCCAGTCCG	TGATTGTGCCGTTGAGTAA
<i>MYD88</i>	GAGTCATGTCAGGCCTACGA	CACAGCTAGACCCCTCCAAT
<i>Dorsal</i>	TCAGTAGCGACACCATGCAG	CGAGCCTTCGAGGAACACTT
<i>LZM</i>	TAGGCGAGTCTCCGTTGTCTGTAG	GAAGAAGAGTCCACCACCCAAGAAC
β -actin	TCCGTAAGGACCTGTATGCC	TCGGGAGGTGCGATGATTTT

1.5.5 肠道菌群

对各样本肠道菌群总DNA进行16S rDNA的V3-V4高变区的PCR扩增^[20],使用的引物序列为338F(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')和806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')。将PCR扩增体系设置为20 μL : 5 \times FastPfu buffer 15 μL ,上下游引物(5 $\mu\text{mol/L}$)各0.2 μL , BSA 0.2 μL , Model模板DNA 2 μL , 2.5 mmol/L dNTPs 2 μL ; FastPfu Polymerase 0.4 μL ;其余用ddH₂O补足体系。PCR反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 高温变性5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸

1 min,40个循环;4 $^{\circ}\text{C}$ 保持。PCR结束后,用2%琼脂糖凝胶电泳检测每个样本的PCR产物。扩增后的样本在Illumina-Mi Seq平台上完成高通量测序。

对测序获得的双端序列数据进行质控处理。根据PE reads之间的Overlap关系,利用FLASH(v1.2.7)将每个样品的reads拼接成原始Tags数据。采用Trimmomatic(v0.33)软件,对原始Tags数据进行过滤得到优质序列。通过UCHIME(v4.2)比对去除序列的嵌合体以获得有效序列。基于QIIME(v18.0)软件,利用UCLUST对序列

相似度 $\geq 97\%$ 的全部 tags 进行聚类形成 OTUs (Operational taxonomic units, OTUs), 所有数据均在数据库 Silva (<https://www.arb-silva.de/>) 中对其进行分类学注释, 绘制不同生物分类水平上的肠道菌群相对丰度和组成结构^[21]。利用 Mother (v.1.30) 软件基于 OTUs 进行 Alpha 多样性分析, 包括 Chao、Chao1、Shannon 和 Simpson 等指数, 使用 QIIME 软件进行 Beta 多样性分析, 主要采用 weighted_unifrac 和 unweighted_unifrac 等几种算法进行 PCoA 分析来对比样本间的差异^[22]。

1.6 数据统计分析

所有数据使用 SPSS 26.0 软件进行统计与分析, 采用 One-way ANOVA 进行单因素方差分析,

再使用 Duncan's 法进行多重比较, 结果以平均值 \pm 标准误 (Mean \pm SE) 表示, 当 $P < 0.05$ 时, 表示存在显著差异。

2 结果

2.1 饲料中添加桑叶水提物对罗氏沼虾幼虾生长性能的影响

如表 3 所示, 与对照组相比, MLWE6、MLWE9 组和 MLWE12 组的幼虾终末体质量、特定生长率和增重率与对照组相比显著升高 ($P < 0.05$), 反之, MLWE6、MLWE9 组和 MLWE12 组的幼虾饲料系数显著降低 ($P < 0.05$)。对照组与各实验组中罗氏沼虾幼虾成活率均高于 60%。

表 3 饲料中添加桑叶水提物对罗氏沼虾幼虾生长性能的影响
Tab. 3 Effect of dietary mulberry leaf water extract on growth performance in juvenile *M. rosenbergii*

生长性能 Growth performance	实验处理组 Experimental treatment groups				
	MLWE0	MLWE3	MLWE6	MLWE9	MLWE12
初始体质量 IBM/g	0.75 \pm 0.09	0.75 \pm 0.09	0.75 \pm 0.09	0.75 \pm 0.09	0.75 \pm 0.09
终末体质量 FBM/g	6.68 \pm 0.72 ^a	6.58 \pm 0.50 ^a	7.38 \pm 0.61 ^b	7.48 \pm 0.33 ^b	7.80 \pm 0.34 ^b
特定生长率 SGR/(%/d)	3.90 \pm 0.19 ^a	3.87 \pm 0.14 ^a	4.08 \pm 0.15 ^b	4.11 \pm 0.08 ^b	4.18 \pm 0.08 ^b
增重率 WGR/%	790.67 \pm 95.87 ^a	777.33 \pm 66.26 ^a	884.00 \pm 80.77 ^b	897.34 \pm 43.61 ^b	940.00 \pm 45.21 ^b
饲料系数 FCR	1.57 \pm 0.27 ^a	1.45 \pm 0.22 ^a	1.26 \pm 0.01 ^b	1.20 \pm 0.25 ^b	1.22 \pm 0.08 ^b

注: 同行数据肩标无字母或相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$), 不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Notes: In the same row, values with no letter or the same letter superscripts mean no significant difference ($P > 0.05$), while with different lowercase letter superscripts mean significant difference ($P < 0.05$).

2.2 饲料中添加桑叶水提物对罗氏沼虾幼虾肠道组织形态的影响

由图 1 可知, 与对照组相比, 饲料中添加了桑叶水提物的 MLWE3、MLWE6 和 MLWE9 组肠道肌肉层厚度减小, 而 MLWE12 组肠道肌肉层厚度变化不明显。与对照组相比, MLWE3、MLWE6 和 MLWE9 组肠道皱襞高度明显增加。与对照组相比, 所有摄食桑叶水提物添加组的幼虾肠道皱襞宽度都明显增加。由图 2 可知, 与对照组相比, 摄食桑叶水提物的幼虾肠道微绒毛长度并无明显变化, 但是肠道微绒毛致密性增加。

2.3 饲料中添加桑叶水提物对罗氏沼虾幼虾抗氧化能力的影响

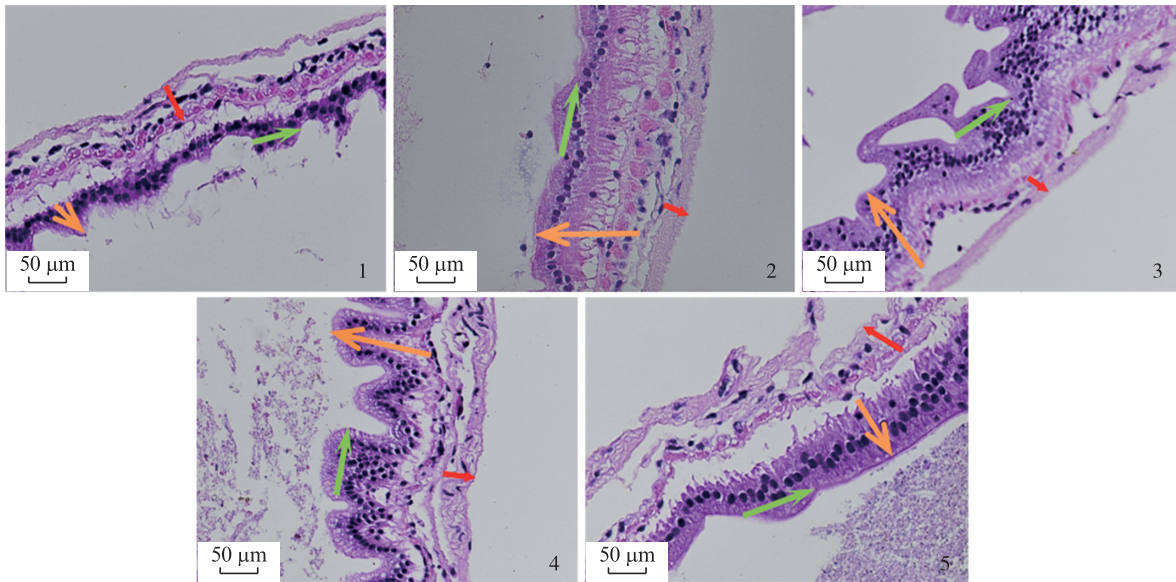
如表 4 所示, 与对照组相比, 饲料中添加了桑叶水提物的各个试验组 MDA、SOD、CAT、GSH-Px 含量均显著降低 ($P < 0.05$)。

2.4 饲料中添加桑叶水提物对罗氏沼虾幼虾肝胰腺组织免疫相关基因表达水平的影响

由图 3 可知, 与对照组相比, MLWE6 组和 MLWE9 组的幼虾肝胰腺组织 *Toll*、*Imd*、*Relish*、*ALF1*、*Dorsal* 和 *LZM* 基因表达量显著升高 ($P < 0.05$), 而 MLWE12 组幼虾 *Toll*、*Imd*、*Relish* 基因表达量显著低于对照组 ($P < 0.05$)。对照组与桑叶水提物添加组的幼虾 *ALF3* 和 *MYD88* 基因表达量差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.5 饲料中添加桑叶水提物对罗氏沼虾幼虾肠道菌群的影响

如表 5 所示, 对照组与实验组的菌群丰度指数 (Chao1 和 ACE)、菌群多样性指数 (Shannon 和 Simpson) 均无显著差异 ($P > 0.05$)。由图 4 可知, 对照组与添加桑叶水提物各实验组幼虾肠道样品中共有 OTUs 数目为 742 个, MLWE0 组、MLWE3 组、MLWE6 组、MLWE9 组和 MLWE12 组幼虾肠道样品分别特有 OTUs 数目为 3 419、3 357、3 185、2 473 和 2 078 个。

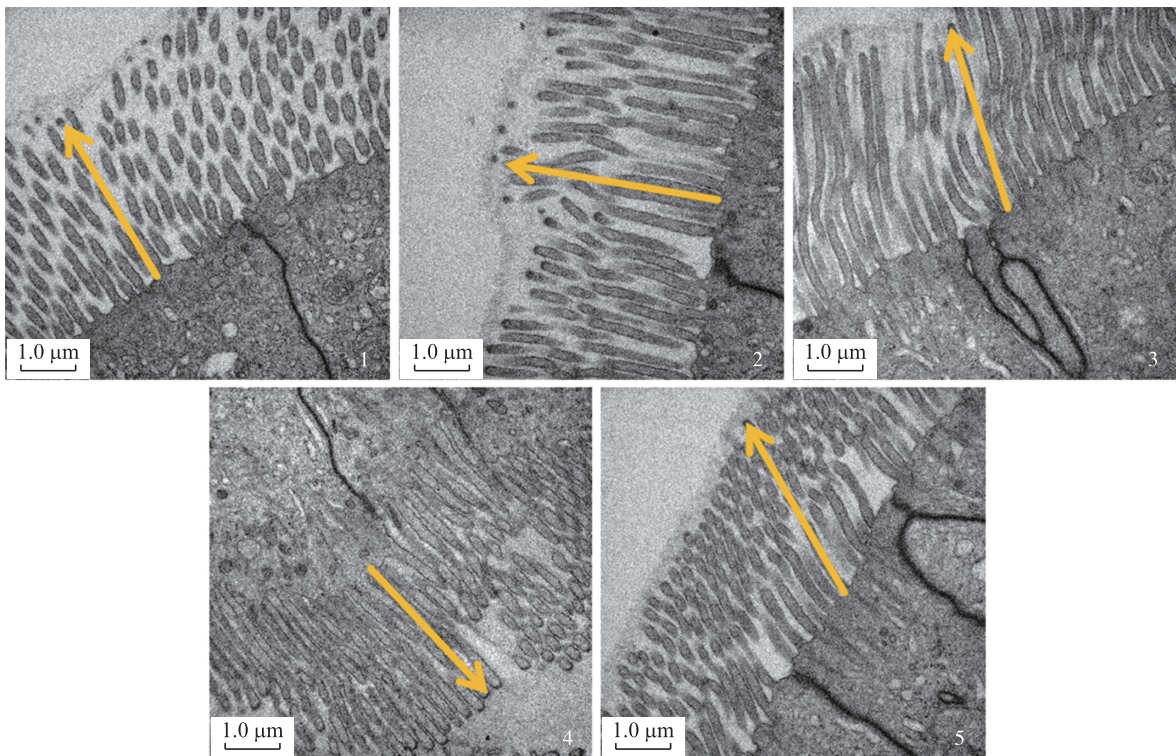


肠道显微照片中箭头表达:红色为肌肉层厚度,橙色为皱襞高度,绿色为皱襞宽度;1~5 分别为 MLWE0、MLWE3、MLWE6、MLWE9 和 MLWE12 组。

Arrows in the micrograph of the intestine are expressed as: red is muscular layer thickness, orange is fold height, and green is fold width; 1~5 refer to groups MLWE0, MLWE3, MLWE6, MLWE9 and MLWE12.

图1 饲料中添加桑叶水提物对罗氏沼虾幼虾肠道组织结构的影响

Fig. 1 Effect of dietary mulberry leaf water extract on intestinal structure in juvenile *M. rosenbergii*



肠道显微照片中箭头表达:黄色为微绒毛长度;1~5 分别为 MLWE0、MLWE3、MLWE6、MLWE9 和 MLWE12 组。

Arrows in the micrograph of the intestine are expressed as: yellow is microvilli length; 1~5 refer to groups MLWE0, MLWE3, MLWE6, MLWE9 and MLWE12.

图2 饲料中添加桑叶水提物对罗氏沼虾幼虾肠道微绒毛形态的影响

Fig. 2 Effect of dietary mulberry leaf water extract on intestinal microvilli morphology in juvenile *M. rosenbergii*

表 4 饲料中添加桑叶水提取物对罗氏沼虾幼虾肝胰腺生化抗氧化酶活力的影响
Tab. 4 Effect of dietary mulberry leaf water extract on hepatopancreas antioxidant enzyme activities in juvenile *M. rosenbergii*

指标 Parameters	组别 Groups				
	MLWE0	MLWE3	MLWE6	MLWE9	MLWE12
丙二醛 MDA/(nmol/mg prot)	49.98±1.29 ^c	30.32±1.47 ^b	33.12±0.09 ^b	24.43±0.70 ^a	21.61±1.20 ^a
超氧化物歧化酶 SOD/(U/mg prot)	7.89±0.42 ^b	3.61±0.26 ^a	3.25±0.11 ^a	4.16±0.53 ^a	4.14±0.33 ^a
过氧化氢酶 CAT/(U/mg prot)	1.16±0.01 ^b	0.55±0.02 ^a	0.46±0.01 ^a	0.58±0.01 ^a	0.61±0.02 ^a
谷胱甘肽过氧化物酶 GSH-Px/(U/L)	82.26±1.64 ^c	32.89±2.28 ^a	25.33±0.99 ^a	50.43±4.66 ^b	57.79±1.62 ^b

注:同行数据肩标无字母或相同字母表示差异不显著($P>0.05$),不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。
Notes: In the same row, values with no letter or the same letter superscripts mean no significant difference ($P>0.05$), while with different lowercase letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$).

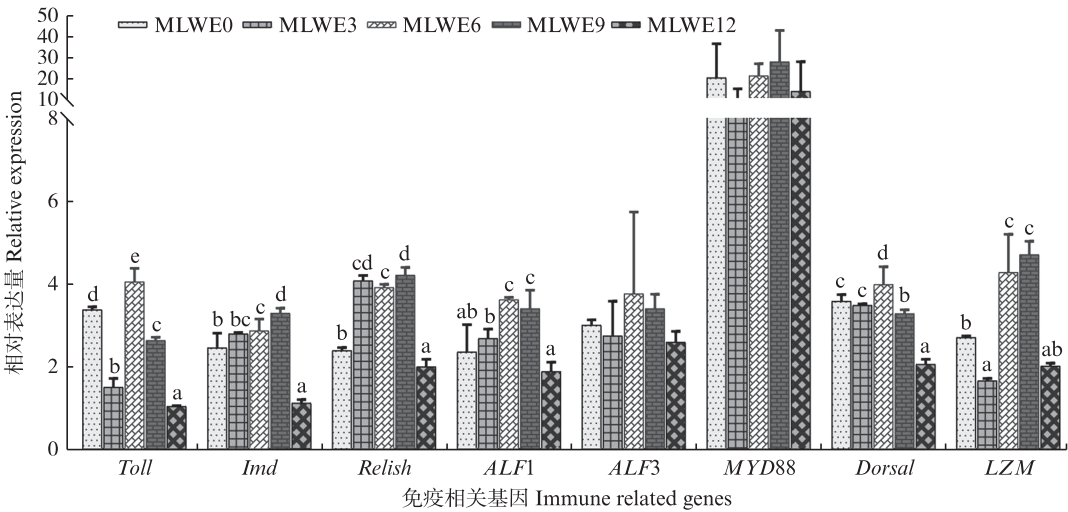


图 3 饲料中添加桑叶水提取物对罗氏沼虾幼虾肠道免疫相关基因表达水平的影响
Fig. 3 Effect of dietary mulberry leaf water extract on intestinal immune-related gene expression in juvenile *M. rosenbergii*

表 5 饲料中添加桑叶水提取物对罗氏沼虾幼虾肠道菌群 Alpha 多样性指数的影响
Tab. 5 Effect of dietary mulberry leaf water extract on alpha diversity indices of intestinal microbiota in juvenile *M. rosenbergii*

指标 Parameters	组别 Groups				
	MLWE0	MLWE3	MLWE6	MLWE9	MLWE12
Chao 1	2 173.54±219.28	2 048.21±81.27	1 992.47±205.65	2 233.13±233.09	1 919.36±274.42
ACE	2 474.87±279.06	2 299.88±116.11	2 129.20±242.28	2 622.35±305.78	2 554.54±777.81
Shannon	4.37±0.17	4.31±0.10	4.08±0.46	4.02±0.67	3.79±0.33
Simpson	0.94±0.01	0.94±0.01	0.91±0.05	0.91±0.08	0.90±0.04

注:同行数据肩标无字母或相同字母表示差异不显著($P>0.05$),不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。
Notes: In the same row, values with no letter or the same letter superscripts mean no significant difference ($P>0.05$), while with different small letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$).

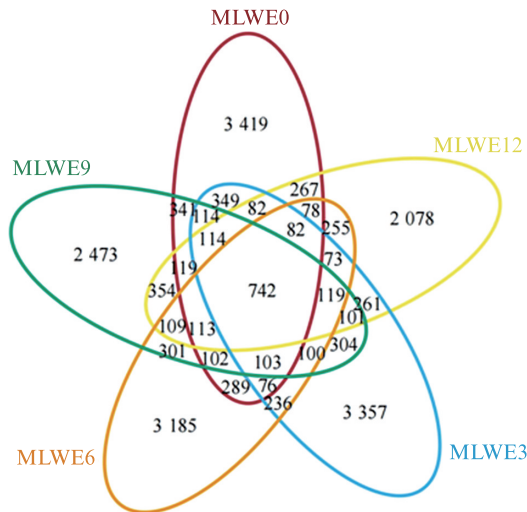


图4 罗氏沼虾幼虾肠道菌群OTUs的韦恩图
Fig. 4 Venn diagram of intestinal microbiota in juvenile *M. rosenbergii*

由图5可知,主坐标分析(PCoA)结果表明对照组与各实验组的肠道样品之间距离较大,其中纵坐标能将对照组与MLWE9组较好地分离开来,而组内差异较小,大都聚集在一起。由图6可知,在门的水平上,对照组与各实验组幼虾肠道优势菌门均为变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、厚壁菌门(Firmicutes)和放线菌门(Actinobacteria)。随着饲料中桑叶水提物的添加,MLWE9和MLWE12组样品中肠道菌群组成丰度与对照组相比出现明显变化,其中厚壁菌门相对丰度明显升高。由图7可知,在属的水平上,对照组与各实验组幼虾肠道主要优势菌

属为肠杆菌属(*Enterobacter*)、肝浆念珠菌属(*Candidatus hepatoplasma*)、乳球菌属(*Lactococcus*)和柠檬酸杆菌属(*Vitrobacter*)。对照组和不同实验组间罗氏沼虾幼虾肠道优势菌属丰度存在明显不同,其中MLWE9和MLWE12组样品中肠道乳球菌属丰度明显高于对照组。进一步对罗氏沼虾肠道菌群在种的水平上进行深度分析结果如表7所示。与对照组相比,在饲料中添加桑叶水提物使得罗氏沼虾幼虾肠道有害菌嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)和霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)丰度显著降低,而金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的丰度在各组间差异并不显著($P>0.05$)。

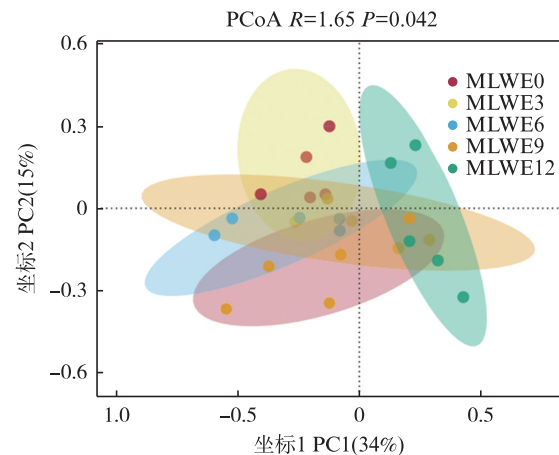


图5 罗氏沼虾幼虾肠道菌群 β 多样性的PCoA分析($n=5$)

Fig. 5 PCoA analysis of β diversity of intestinal microbiota in the juvenile *M. rosenbergii* ($n=5$)

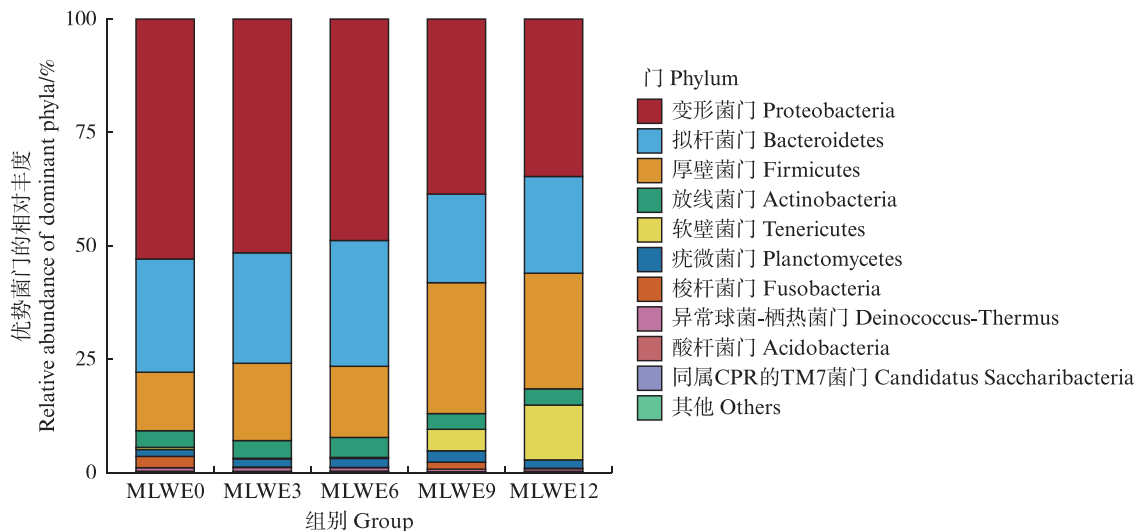


图6 饲料中添加桑叶水提物对罗氏沼虾幼虾肠道菌群主要组成相对丰度(门水平)的影响
Fig. 6 Effect of dietary mulberry leaf water extract on relative abundance of intestinal microbiota in juvenile *M. rosenbergii* (phylum level)

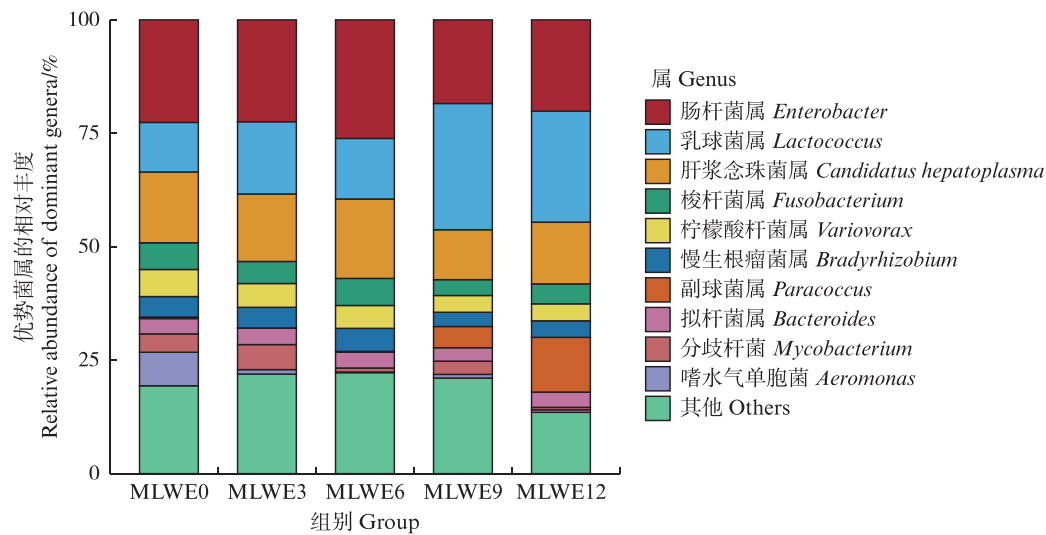


图7 饲料中添加桑叶水提物对罗氏沼虾幼虾肠道菌群主要组成相对丰度(属水平)的影响

Fig. 7 Effect of dietary mulberry leaf water extract on relative abundance of major bacteria in juvenile *M. rosenbergii* (genus level)

表6 饲料中添加桑叶水提物对罗氏沼虾幼虾肠道菌群种水平上差异性的影响
Tab. 6 Effect of dietary mulberry leaf water extract on differences in species levels of intestinal microbiota in juvenile *M. rosenbergii*

指标 Parameters	组别 Groups				
	MLWE0	MLWE3	MLWE6	MLWE9	MLWE12
嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophila</i>	0.017±0.006 ^a	0.019±0.006 ^b	0.002±0.000 ^b	0.001±0.000 ^b	0.002±0 ^b
霍乱弧菌 <i>Vibrio cholerae</i>	0.033±0.003 ^a	0.001±0.001 ^b	0±0 ^b	0±0 ^b	0±0 ^b
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	0±0	0.002±0	0.002±0.001	0±0	0±0

注:同行数据肩标无字母或相同字母表示差异不显著($P>0.05$),不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

Notes: In the same row, values with no letter or the same letter superscripts mean no significant difference ($P>0.05$), while with different small letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$).

3 讨论

3.1 饲料中添加桑叶水提物对罗氏沼虾幼虾生长性能的影响

本实验结果显示饲料中添加桑叶水提物显著提高了罗氏沼虾幼虾生长性能和饲料效率。陈祥^[23]在黑斑蛙(*Rana nigromaculata*)饲料中添加0.3%和1.2%桑叶提取物,发现均能显著提高黑斑蛙的增重率和特定生长率;冯麒凤等^[24]在大鲵(*Andrias davidianus*)饲料中添加0.75%桑叶提取物也能促进其生长性能;钟文豪等^[25]在大口黑鲈饲料中添加0.5%和1.0%桑叶低聚糖,发现均能显著提高其增重率和特定生长率,并显著降低饲料系数。试验表明,添加0.9%和1.2%桑叶水提物有益于提高罗氏沼虾幼虾的生长性能,这与上述实验结果相似,可能是因为桑叶水提物富含多种天然活性成分,可以提高罗氏沼虾幼虾肠

道组织消化能力,从而促进其对营养的吸收并提高其生长率,也有学者指出鱼类饲料中添加桑叶可以通过在消化过程中降低抗营养因子含量,从而促进其生长性能^[15]。因此,本研究系统分析了摄食不同浓度的桑叶水提物的罗氏沼虾幼虾肠道组织形态与菌群结构。然而,王咏梅等^[17]研究表明饲料中添加桑叶黄酮对凡纳滨对虾的各项生长性能指标均无显著影响,这可能是桑叶的加工、提取方式和物质活性不同所导致的差异。

3.2 饲料中添加桑叶水提物对罗氏沼虾幼虾肠道组织形态的影响

水产动物的肠道不仅起着消化和吸收营养物质的重要作用,还承担维持机体内部环境稳定的职责^[26]。一般来说,肠道消化吸收功能取决于肠道绒毛的形态特征,而肌层的厚度影响着营养物质的吸收和运输效率^[27]。此外,肠道皱襞的高

度也是评估其吸收营养物质能力的重要指标之一^[28]。在比较桑叶水提物和醇提物对罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)肠道组织结构影响的试验中,两种提取物对罗非鱼的中后肠产生了显著影响,10%水提物和10%醇提物组的鱼体肠壁厚度高于桑叶粉组^[12]。在鳊基础饲料中添加桑叶水提物的试验中,与未添加对照组相比,添加桑叶水提物后的鳊肠道褶皱明显增多,绒毛数量也有所增加^[16]。在凡纳滨对虾研究中表明,饲料中添加桑叶黄酮不仅可以促进肠道绒毛发育,还能增加肠道肌肉层厚度^[18]。与对照组相比,本试验组中的罗氏沼虾幼虾肠道微绒毛长度虽无明显变化,但肠道微绒毛致密性的增加促进微绒毛的发育,绒毛面积扩大,使得吸收能力提高,弥补了物理消化能力不强的缺陷。上述研究说明饲料中添加桑叶提取物后,会使罗氏沼虾幼虾肠道与食物接触面积增大,吸收营养物质的能力增强,进而对罗氏沼虾幼虾肠道健康起到一定的改善作用。

3.3 饲料中添加桑叶水提物对罗氏沼虾幼虾抗氧化能力与免疫机能的影响

MDA 是细胞膜脂质过氧化的最终产物,通过测定其含量能够间接反映脂质氧化反应的程度^[29]。周东来等^[16]的研究表明,添加适量的桑叶提取物显著提高鳊血清中谷胱甘肽含量,降低MDA含量。周思顺等^[30]的研究表明,饲料中添加桑叶提取物可以显著提高花鲈(*Lateolabrax maculatus*)血清中SOD活性,但对其头肾组织中的SOD活性无显著影响。而在本试验中,摄食桑叶水提物的罗氏沼虾幼虾,其肝胰腺组织中MDA含量显著低于对照组,说明在饲料中添加桑叶提取物可提高罗氏沼虾幼虾的抗氧化能力。同时,抗氧化酶活性的升高说明机体受到了一定的刺激,实验组中罗氏沼虾幼虾肝胰腺的抗氧化酶SOD、CAT和GSH-PX活性降低,说明摄食桑叶水提物的幼虾机体处于抗氧化作用动态平衡状态。

3.4 饲料中添加桑叶水提物对罗氏沼虾幼虾免疫相关基因表达水平的影响

甲壳动物大多利用先天免疫系统进行自我防御,其中包含体液免疫和细胞免疫。体液免疫包含对微生物的识别、信号转导(如Toll通路、IMD通路)以及免疫效应物的产生^[31],其中Toll

通路和IMD通路是调控抗菌肽基因表达的重要信号通路^[32]。本研究通过检测罗氏沼虾幼虾Toll、Imd、Relish、ALF1、ALF3、MYD88、Dorsal和LZM基因表达水平,来研究饲料中添加桑叶水提物对罗氏沼虾幼虾免疫机能的影响。在比较凡纳滨对虾饲料中添加3种不同添加剂的试验中,丁酸梭菌CBG01活菌使对虾肝胰腺中所有免疫相关基因(SOD、LZM、eIF4E1 α 、eIF4E2、HSP70、proPO、Imd、Toll、LGBP、Relish、TOR、4E-BP)相对表达量均显著升高^[33],这与本试验结果相类似。相较于甲壳动物,发酵桑叶能够调节鱼类炎症反应基因表达水平^[34];桑叶多糖能增强长期大负荷运动小鼠(*Mus musculus*)机体免疫功能,调节免疫细胞及免疫分子^[35]。综上,桑叶水提物对提高罗氏沼虾幼虾免疫机能具有良好效果的原因,可能是由于其富含的黄酮类和多糖类生物活性物质,能够促进幼虾机体免疫基因转录激活,具体作用机制仍需进一步研究。

3.5 饲料中添加桑叶水提物对罗氏沼虾幼虾肠道菌群的影响

目前,关于虾类肠道核心菌群的研究已有相继报道,GAO等^[36]研究雄性罗氏沼虾的肠道优势菌,发现主要为变形菌门,其次为厚壁菌门。XIONG等^[37]研究摄食添加不同 α -硫酸锌饲料的日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)肠道菌群,发现主要为变形菌门、厚壁菌门和放线菌门。本试验研究得到摄食不同浓度桑叶水提物饲料的罗氏沼虾肠道优势菌组成与上述研究结果相似。由于变形菌门含有弧菌科、红杆菌科等条件致病菌,其丰度增加会提高养殖对象的致病风险,本研究摄食高浓度桑叶水提物饲料的罗氏沼虾肠道中的变形菌门丰度低于对照组,故推测饲料中添加桑叶水提物会促使罗氏沼虾患病的风险降低。

肠道内菌群结构与肠道健康密切相关,肠道菌群不仅参与消化吸收过程,还有助于抵御外来细菌入侵机体,发挥着生物屏障的作用^[38]。在大口黑鲈日常饲料中添加桑叶低聚糖的试验中,与对照组相比,试验组大口黑鲈肠道中不动杆菌属、乳杆菌属和芽孢杆菌属等有益菌相对丰度均有所提高,改善肠道益生菌相对丰度^[25],从而调节细胞凋亡^[39]。本试验中,与对照组相比,实验组罗氏沼虾幼虾肠道菌群中厚壁菌门的相对丰

度有所提高,厚壁菌门通常多有益菌^[40],特别是益生菌乳球菌属与对照组相比明显升高,这提示桑叶水提物中多糖等物质能够改善罗氏沼虾幼虾的肠道菌群结构以增强肠道屏障功能。有研究表明,添加桑叶多糖^[41]和桑叶粉^[42]等可以促进小鼠肠道有益菌的生长并抑制有害菌的生长,改善肠道菌群结构。由此本研究更关注摄食桑叶水提物的罗氏沼虾肠道中条件致病菌丰度的变化趋势,如嗜水气单胞菌、霍乱弧菌、金黄色葡萄球菌,三者都是条件致病菌^[43],本实验结果显示,摄食桑叶水提物的幼虾肠道内嗜水气单胞菌和霍乱弧菌丰度显著降低,条件致病菌的丰度降低会减少幼虾发病的可能性,降低幼虾养殖疾病暴发的风险。

4 结论

综上所述,在罗氏沼虾幼虾饲料中添加适量的桑叶水提物,可有效提高罗氏沼虾幼虾生长性能,提高机体的抗氧化能力,促进肠道健康。在本试验条件下,以幼虾增重率和免疫相关基因表达量为指标,罗氏沼虾幼虾饲料中桑叶水提物的适宜添加水平为6~9 g/kg。

作者声明本文无利益冲突。

参考文献:

- [1] KAWAMURA G, BAGARINAO T, YONG A S K, et al. Colour preference and colour vision of the larvae of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* [J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2016, 474: 67-72.
- [2] ZHOU D D, LIU S S, GUO G Y, et al. Virome analysis of normal and growth retardation disease-affected *Macrobrachium rosenbergii* [J]. Microbiology Spectrum, 2022, 10(6): e0146222.
- [3] 刘波,周群兰,缪凌鸿,等.水产动物营养与免疫研究进展[J].水产学报,2022,46(10):1761-1775.
LIU B, ZHOU Q L, MIAO L H, et al. Research progress in nutrition and immunity of aquatic animals[J]. Journal of Fisheries of China, 2022, 46(10): 1761-1775.
- [4] 许燕,余静,王芳,等.酵母细胞壁多糖和硫化氢对罗氏沼虾3种免疫酶活性的影响[J].水生生物学报,2014,38(2):382-385.
XU Y, YU J, WANG F, et al. Effects of yeast cell wall polysaccharides and H₂S on the activities of three immune enzymes of *Macrobrachium rosenbergii* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2014, 38(2): 382-385.
- [5] 吴维福,陈雯雯,李郁娇,等.三丁基锡对罗氏沼虾血清中免疫酶活力的影响[J].广东海洋大学学报,2014,34(3):17-21.
WU W F, CHEN L L, LI Y J, et al. Effects of tributyltin on the activities of immunologic enzyme in blood serum of the *Macrobrachium rosenbergii* [J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2014, 34(3): 17-21.
- [6] CHEN S K, XI M M, GAO F, et al. Evaluation of mulberry leaves' hypoglycemic properties and hypoglycemic mechanisms [J]. Frontiers in Pharmacology, 2023, 14: 1045309.
- [7] LYU Q Y, LIN J R, WU X Y, et al. Novel active compounds and the anti-diabetic mechanism of mulberry leaves [J]. Frontiers in Pharmacology, 2022, 13: 986931.
- [8] JESZKA-SKOWRON M, FLACZYK E, PODGÓRSKI T. *In vitro* and *in vivo* analyses of *Morus alba* Polish var. wielkolistna zolwinska leaf ethanol-water extract—antioxidant and hypocholesterolemic activities in hyperlipideamic rats [J]. European Journal of Lipid Science and Technology, 2017, 119(10): 1600514.
- [9] KIM D, KANG K H. Anti-inflammatory and anti-bacterial potential of mulberry leaf extract on oral microorganisms [J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2022, 19(9): 4984.
- [10] CHENG M, SHI Y B, CHENG Y M, et al. Mulberry leaf polysaccharide improves cyclophosphamide-induced growth inhibition and intestinal damage in chicks by modulating intestinal flora, enhancing immune regulation and antioxidant capacity [J]. Frontiers in Microbiology, 2024, 15: 1382639.
- [11] ZHAO X J, LI L, LUO Q L, et al. Effects of mulberry (*Morus alba* L.) leaf polysaccharides on growth performance, diarrhea, blood parameters, and gut microbiota of early-weanling pigs [J]. Livestock Science, 2015, 177: 88-94.
- [12] 杨继华,陈冰,黄燕华,等.饲料中添加桑叶黄酮对吉富罗非鱼生长性能、体成分、抗氧化指标及抗亚硝酸盐应激能力的影响[J].动物营养学报,2017,29(9):3403-3412.
YANG J H, CHEN B, HUANG Y H, et al. Effects of dietary mulberry leaf flavonoids on growth performance, body composition, antioxidant indices and resistance to nitrite exposure of genetic improvement of farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2017, 29(9): 3403-3412.
- [13] WEI Y X, HUANG J, SUN H, et al. Impact of different processing mulberry leaf on growth, metabolism and liver immune function of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) [J]. Aquaculture Reports, 2023, 29: 101508.

- [14] JIANG W Q, LIN Y, QIAN L J, et al. Mulberry leaf polysaccharides attenuate oxidative stress injury in peripheral blood leukocytes by regulating endoplasmic reticulum stress[J]. *Antioxidants*, 2024, 13(2): 136.
- [15] NING L J, GAO L L, ZHOU W, et al. Beneficial effects of dietary mulberry leaf along with multi-enzyme premix on the growth, immune response and disease resistance of golden pompano *Trachinotus ovatus* [J]. *Aquaculture*, 2021, 535: 736396.
- [16] 周东来, 刘凡, 杨琼, 等. 桑叶水提物对鳊生长、脂质代谢、抗氧化能力和肝脏肠道健康的影响[J]. *中国水产科学*, 2023, 30(2): 206-217.
- ZHOU D L, LIU F, YANG Q, et al. Effects of mulberry leaf water extract on growth, lipid metabolism, antioxidant capacity, and liver and intestinal health of *Siniperca chuatsi* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2023, 30(2): 206-217.
- [17] 王咏梅, 陈冰, 王国霞, 等. 饲料中添加桑叶黄酮对凡纳滨对虾生长性能、抗氧化指标及抗胁迫能力的影响[J]. *中国水产科学*, 2020, 27(10): 1184-1195.
- WANG Y M, CHEN B, WANG G X, et al. Effects of dietary mulberry leaf flavonoids on growth performance, antioxidant indices, and anti-hypoxic stress ability of *Litopenaeus vannamei* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2020, 27(10): 1184-1195.
- [18] 王咏梅, 陈冰, 曹俊明, 等. 桑叶黄酮对凡纳滨对虾肠道黏膜形态和肠道菌群的影响[J]. *动物营养学报*, 2020, 32(4): 1817-1825.
- WANG Y M, CHEN B, CAO J M, et al. Effects of mulberry leaf flavonoids on intestinal mucosal morphology and intestinal flora of *Litopenaeus vannamei* [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2020, 32(4): 1817-1825.
- [19] SUN S M, BIAN C, ZHOU N, et al. Dietary *Astragalus* polysaccharides improve the growth and innate immune response of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*: insights from the brain-gut axis [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 243: 125158.
- [20] 曾晨熾, 林茂, 李忠琴, 等. 基于16S rRNA基因扩增子测序分析日本囊对虾肠道菌群结构与功能的特征[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(6): 1857-1866.
- ZENG C X, LIN M, LI Z Q, et al. The structural and functional characteristics of the gut microbiota of *Marsupenaeus japonicus* as revealed by 16S rRNA gene amplicon sequencing [J]. *Microbiology*, 2020, 47(6): 1857-1866.
- [21] LAKHJANI V, BADAPANDA C. prepare_taxa_charts.py: a Python program to automate generation of publication ready taxonomic pie chart images from QIIME [J]. *Genomics Data*, 2017, 12: 97-101.
- [22] DOUGLAS G M, MAFFEI V J, ZANEVELD J R, et al. PICRUSt2 for prediction of metagenome functions [J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(6): 685-688.
- [23] 陈祥. 桑叶提取物对黑斑蛙生长性能、肠道及肝脏功能的影响[D]. 重庆: 西南大学, 2023.
- CHEN X. Effects of mulberry leaf extract on growth performance, intestinal tract and liver function of *Rana nigromaculata* [D]. Chongqing: Southwest University, 2023.
- [24] 冯麒麟, 李战福, 黄先智, 等. 日粮中添加桑叶提取物和1-脱氧野尻霉素对大鲵生长、消化、免疫能力和肠道菌群的影响[J]. *水生生物学报*, 2021, 45(3): 582-592.
- FENG Q F, LI Z F, HUANG X Z, et al. Effects of dietary mulberry leaf extract and 1-deoxynojirimycin on growth, digestion and immunity capacity, and intestinal microorganism of Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2021, 45(3): 582-592.
- [25] 钟文豪, 黎尔纳, 李庆荣, 等. 桑叶低聚糖对大口黑鲈生长性能以及肠道消化酶活性、免疫功能和菌群的影响[J]. *动物营养学报*, 2024, 36(3): 1795-1805.
- ZHONG W H, LI E N, LI Q R, et al. Effects of mulberry leaf Oligosaccharides on growth performance, intestinal digestive enzyme activity, immune function and microflora of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2024, 36(3): 1795-1805.
- [26] 吕于明, 刘丹, 张炳坤. 家禽肠道屏障功能及其营养调控[J]. *动物营养学报*, 2014, 26(10): 3091-3100.
- GUO Y M, LIU D, ZHANG B K. Intestinal barrier of poultry: function and modulation[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2014, 26(10): 3091-3100.
- [27] 黄玉章, 林旋, 王全溪, 等. 黄芪多糖对罗非鱼肠绒毛形态结构及肠道免疫细胞的影响[J]. *动物营养学报*, 2010, 22(1): 108-116.
- HUANG Y Z, LIN X, WANG Q X, et al. Effects of *Astragalus* polysaccharide on structure of intestinal villus and intestinal immunocyte of *Tilapia* [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2010, 22(1): 108-116.
- [28] 张敏, 邹晓庭, 孙雅丽. 外源性谷氨酰胺对艾维茵肉仔鸡生长性能和小肠发育的影响[J]. *中国畜牧杂志*, 2009, 45(9): 32-36.
- ZHANG M, ZOU X T, SUN Y L. Supplement of Glutamine on growth performance and intestinal mucosae development in avian broilers [J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2009, 45(9): 32-36.
- [29] 荣华, 夏优, 王晓雯, 等. 饲料中添加脯氨酸对浅色黄姑鱼生长、体组成及抗氧化能力的影响[J]. *上海海洋大学学报*, 2023, 32(1): 89-97.
- RONG H, XIA Y, WANG X W, et al. Effects of dietary

- proline on growth, body composition and antioxidant capacity of Chu's croaker (*Nibea coibor*) [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2023, 32(1): 89-97.
- [30] 周思顺, 林豪, 孔鲁闽, 等. 桑叶提取物对花鲈抗氧化能力和非特异性免疫的影响[J]. 水生生物学报, 2024, 48(9): 1483-1493.
- ZHOU S S, LIN H, KONG L M, et al. Mulberry leaf extract on antioxidative capacity and non-specific immune of *Lateolabrax maculatus* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2024, 48(9): 1483-1493.
- [31] LI F H, XIANG J H. Signaling pathways regulating innate immune responses in shrimp [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 34(4): 973-980.
- [32] 袁伟, 戴习林, 戈潘缘元, 等. RNA干扰不同类型TLR基因对罗氏沼虾免疫相关基因表达的影响[J]. 上海海洋大学学报, 2021, 30(4): 590-600.
- YUAN W, DAI X L, GE P Y Y, et al. Effects of RNA interferences with different Toll-like receptors on the expression of immune-related genes in *Macrobrachium rosenbergii* [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2021, 30(4): 590-600.
- [33] 田相利, 秦光彩, 罗凯, 等. 3种不同添加剂对凡纳滨对虾生长、非特异免疫和抗病力的影响[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2024, 54(2): 33-43.
- TIAN X L, QIN G C, LUO K, et al. Effects of three additives on growth performance, non-specific immunity and disease resistance of *Litopenaeus vannamei* [J]. Periodical of Ocean University of China, 2024, 54(2): 33-43.
- [34] JIANG W Q, QIAN L J, MU Q Q, et al. Endoplasmic reticulum stress and Ca^{2+} dysregulation in response to ammonia nitrogen exposure could be alleviated by dietary fermented mulberry leaf meal in *Megalobrama amblycephala* [J]. Aquaculture, 2024, 593: 741256.
- [35] 李小兵. 桑叶多糖对长期大负荷运动训练小鼠免疫功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(24): 269-272.
- LI X B. Effect of mulberry leaves polysaccharide on immune function in mice with long-term heavy training [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2012, 18(24): 269-272.
- [36] GAO Q X, LUO J P, LIU P M, et al. Characteristics of intestinal microbiota in male morphotypes of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* [J]. Aquaculture, 2022, 555: 738200.
- [37] XIONG Y F, LI Q M, DING Z L, et al. Dietary α -lipoic acid requirement and its effects on antioxidant status, carbohydrate metabolism, and intestinal microflora in oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* (De Haan) [J]. Aquaculture, 2022, 547: 737531.
- [38] 董学兴, 吕林兰, 赵卫红, 等. 不同养殖模式下罗氏沼虾肠道菌群结构特征及其与环境因子的关系[J]. 上海海洋大学学报, 2019, 28(4): 501-510.
- DONG X X, LYU L L, ZHAO W H, et al. Effects of different cultural patterns on microbial communities in the intestine of *Macrobrachium rosenbergii* and interactions with environment factors [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2019, 28(4): 501-510.
- [39] YANG M Q, JIANG D H, ZHANG L L, et al. Mulberry (*Morus alba*) leaves improved the growth and intestinal health in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) fed a cottonseed protein concentrate-based diet [J]. Aquaculture, 2024, 592: 741212.
- [40] YIN C M, NORATTO G D, FAN X Z, et al. The impact of mushroom polysaccharides on gut microbiota and its beneficial effects to host: a review [J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 250: 116942.
- [41] 陈涟昊, 张霞, 孙世芳, 等. 桑叶多糖调节小鼠肠道菌群失调的研究 [J]. 现代药物与临床, 2015, 30(6): 633-636.
- CHEN L H, ZHANG X, SUN S F, et al. Regulation of *Morus alba* polysaccharides on disturbance of intestinal flora in mice [J]. Drugs & Clinic, 2015, 30(6): 633-636.
- [42] CHEN Y, NI J J, LI H W. Effect of green tea and mulberry leaf powders on the gut microbiota of chicken [J]. BMC Veterinary Research, 2019, 15(1): 77.
- [43] KUMRU S, TEKEDAR H C, BLOM J, et al. Genomic diversity in flavobacterial pathogens of aquatic origin [J]. Microbial Pathogenesis, 2020, 142: 104053.

Effects of dietary mulberry leaf water extract on growth performance, intestinal health and immune function of juvenile *Macrobrachium rosenbergii*

LIU Zexuan^{1,2}, ZHONG Yuhui¹, CHEN Luqian¹, YANG Qibin³, SUN Shengming^{1,2}

(1. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Key Laboratory of Efficient Utilization and Processing of Marine Fishery Resources of Hainan Province, Sanya Tropical Fisheries Research Institute, Sanya 572018, Hainan, China)

Abstract: This experiment was designed to investigate the effects of dietary different concentrations of mulberry leaf polysaccharide (MLWE) on the growth performance, hepatopancreas immune indicators, antioxidant capacity, and intestinal health of *Macrobrachium rosenbergii* juveniles. The basal diet without mulberry leaf extract was used as the control group (MLWE0), and on this basis, 3 g/kg (MLWE3 group), 6 g/kg (MLWE6 group), 9 g/kg (MLWE9 group) and 12 g/kg (MLWE12 group) of mulberry leaf extract were added to the basal diet to prepare five groups of isonitrogenous and isolithiatric diets, respectively. The healthy and active larvae of *M. rosenbergii* juveniles with initial body weight of (0.75 ± 0.09) g were selected as the research objects. Each experimental group was set up with 3 replicates, and the experimental period was 56 days. The results indicated that: In comparison with the control group, the final average weight, specific growth rate and weight gain rate of the MLWE6, MLWE9, and MLWE12 groups increased significantly ($P < 0.05$), on the contrary, there was lower feed conversion ratio in MLWE6, MLWE9, and MLWE12 groups than that of the control group ($P < 0.05$). With the increase of MLWE supplemental level in dietary, the thickness of intestinal muscle layer decreased in groups of MLWE3, MLWE6, and MLWE9, while there was an increase in height and width of intestinal folds compared with the control group. Although there were no notable changes in intestinal microvilli height between the control group and treatment groups, high density of intestinal microvilli was observed on experimental group. Significantly lower levels ($P < 0.05$) for malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GSH-Px) were observed on the experimental groups compared to the control group, in addition, compared to the control group, there were higher expression levels of immune-related gene in hepatopancreas of prawn fed diets with 6 and 9 g/kg mulberry leaf water extract ($P < 0.05$), the relative abundance of pathogenic bacteria (such as *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio cholera*) in the intestinal microbiota of *M. rosenbergii* juveniles was significantly reduced in the MLWE6, MLWE9, and MLWE12 groups ($P < 0.05$). In conclusion, adding appropriate concentrations of MLWE to the basic diet of *M. rosenbergii* juveniles can promote their growth, enhance their non-specific immunity, and improve gut health. Based on the comprehensive analysis and the index of weight gain rate, it is suggested that the appropriate addition level for mulberry leaf water extract in the diet of *M. rosenbergii* juveniles is between 6 and 9 g/kg.

Key words: *Macrobrachium rosenbergii*; mulberry leaf water extract; growth; intestinal health; immune function