

卤虫无节幼体的营养强化对半滑舌鲷稚鱼生长、消化酶及相关激素水平的影响

马 静^{1,2} 秦帮勇^{1,2} 于朝磊^{1,2} 常 青^{1*}

(¹中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(²上海海洋大学水产与生命学院, 201306)

摘 要 通过投喂经蛋氨酸及裂壶藻强化的卤虫, 研究其对半滑舌鲷稚鱼(初始体长 1.67 ± 0.14 cm) 生长性能、主要消化酶活性(淀粉酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶)、碱性磷酸酶活性及胆囊收缩素(CCK)、甲状腺素(T4)、三碘甲状腺原氨酸(T3)和皮质醇浓度的影响。试验设 3 个实验组(蛋氨酸组、裂壶藻组和蛋氨酸加裂壶藻组), 分别投喂经蛋氨酸、裂壶藻及蛋氨酸+裂壶藻强化的卤虫, 对照组投喂未经强化的卤虫。试验进行 16d, 每 4d 取样 1 次。结果显示, 裂壶藻组的体长和体重在试验结束时处于最高水平, 体重显著高于对照组($P < 0.05$), 体长在 12d 时显著高于其他组($P < 0.05$)。裂壶藻组碱性磷酸酶活力在 16d 时显著高于蛋氨酸组和对照组, 胰蛋白酶活力在 16d 时显著高于其他组($P < 0.05$), T3 含量在 12d 时显著高于蛋氨酸组及对照组, T4 水平在 12d 时显著高于对照组($P < 0.05$)。蛋氨酸加裂壶藻组淀粉酶活力在 12d 时显著高于蛋氨酸组($P < 0.05$)。对照组的 CCK 含量在 4d 时显著高于蛋氨酸组和蛋氨酸加裂壶藻组($P < 0.05$), 12d 显著高于 3 个实验组, 16d 时显著高于裂壶藻组($P < 0.05$)。蛋氨酸组的皮质醇含量在 4d 时显著低于其他 3 个试验组($P < 0.05$), 8d 和 16d 时显著低于对照组及蛋氨酸加裂壶藻组($P < 0.05$)。其碱性磷酸酶、淀粉酶活力及 T4 和 T3 水平在试验前期都较高, 说明蛋氨酸强化的卤虫投喂对半滑舌鲷稚鱼的生长及激素水平有较微弱的促进作用, 可能是由于卤虫无节幼体含有的蛋氨酸基本可以满足鱼体生长需要。

关键词 蛋氨酸 半滑舌鲷 稚鱼 消化酶 胆囊收缩素

中图分类号 Q953+.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2012)06-0035-09

Effects of nutrition-enriched *Artemia nauplii* on growth, digestive enzyme and associated hormones in tongue sole *Cynoglossus semilaevis* postlarvae

MA Jing^{1,2} QIN Bang-yong^{1,2} YU Chao-lei^{1,2} CHANG Qing^{1*}

(¹Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(²College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, 201306)

ABSTRACT Effects of methionine enriched *Artemia nauplii* on growth performance, main digestive enzymes (amylase, acid protease, and alkali protease) activity, alkaline phosphatase

国家自然科学基金项目(31101913)和青岛市应用基础项目(08-1-3-26-jch)共同资助

* 通讯作者。E-mail: changqing@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2012-06-07; 接受日期: 2012-06-29

作者简介: 马 静(1986-), 女, 硕士研究生, 主要从事水产动物营养与生理研究。E-mail: majing-1986214@163.com

activity and concentration of digestion related hormones (cholecystokinin, thyroxin, triiodothyronine, and cortisol) in *Cynoglossus semilaevis* Günther (initial length 1.67 ± 0.14 cm) were studied. Three groups of postlarvae, including methionine group, *Schizochytrium* group, and methionine + *Schizochytrium* group, were fed *Artemia* nauplii enriched with methionine, *Schizochytrium*, and methionine + *Schizochytrium* respectively. A control group was fed *Artemia* nauplii without enrichment. Larvae were cultured for 16 days, sampled and tested at 4-day intervals. Postlarvae in the *Schizochytrium* treatment showed the highest growth at the end of the experiment; their weight was significantly greater than the control ($P < 0.05$), and their length was significantly greater than other treatments at 12d. Alkaline phosphatase activity in *Schizochytrium* treatment was significantly greater than the methionine treatment and the control at 16d ($P < 0.05$), and their alkali protease activity was significantly greater than the other treatments at 16d ($P < 0.05$). The concentration of triiodothyronine (T3) in *Schizochytrium* treatment was significantly higher than the methionine treatment and the control at 12d ($P < 0.05$). Thyroxin (T4) content in *Schizochytrium* treatment was significantly greater than the control at 12d ($P < 0.05$). Amylase activity in methionine + *Schizochytrium* treatment was significantly greater than the methionine treatment at 12d ($P < 0.05$). CCK level of the control was significantly higher than methionine + *Schizochytrium* treatment and methionine treatment at 4d ($P < 0.05$), and was significantly higher than the other treatments or *Schizochytrium* treatment at 12d and 16d. No significant differences were found in acid protease activity between four different treatments. Cortisol levels of methionine treatment was significantly lower than the other treatments at 4d, and significantly lower than the control and methionine + *Schizochytrium* treatment at 8d and 16d ($P < 0.05$). However, alkaline phosphatase, amylase activity, T3 and T4 levels were higher at the earlier stages of the experiment. It is suggested that methionine-enriched *Artemia* nauplii feeding can meet the growth requirement of *C. semilaevis* larvae.

KEY WORDS Methionine *Cynoglossus semilaevis* Postlarvae Digestive enzyme
Cholecystokinin

海水鱼类在早期发育阶段,其消化功能的发育尚不完全(Naz *et al.* 2009b),蛋白酶活性较低(常青等 2005),肠道对大分子物质的消化吸收能力有限,尤其是蛋白质类的复杂聚合物,而对于游离氨基酸(FAA)的吸收要高于多肽和蛋白质中氨基酸的吸收(刘镜格 2003)。并且,在仔鱼发育的早期阶段,FAA 不仅被用于合成体蛋白,同时也被用于能量消耗(Rønnestad *et al.* 1993; Finn *et al.* 2002)。因此,仔鱼开口摄食时需要更多的 FAA 维持正常的生长发育。一般海水浮游动物中都具有大的 FAA 库,它们被广泛用于海水仔鱼的培育。生产中常用的仔鱼活饵料有轮虫、卤虫无节幼体和桡足类等。卤虫体内 FAA 及不饱和脂肪酸含量均不如野生桡足类(Bell *et al.* 2003; Helland *et al.* 2003),研究认为桡足类哲水蚤的使用有利于提高比目鱼 *Hippoglossus hippoglossus* 背部的色素沉着,眼睛的移位及视网膜的发育(Næss *et al.* 1995; Næss *et al.* 1998; Shields *et al.* 1999),是海水仔鱼的早期最佳饵料。然而野生桡足类很难保证足够的数量,并且会增加仔鱼患病的风险,生产中通常使用强化的轮虫和卤虫。研究表明,通过直接强化方法可以将营养物质强化给卤虫(Naz *et al.* 2009a,b; Helland *et al.* 2000; Tonheim *et al.* 2000; 马静等 2012),来保证仔鱼的营养需求。

本研究通过投喂经不同营养物质强化的卤虫无节幼体,研究不同强化物质对半滑舌鳎稚鱼的生长性能、消化功能和内分泌激素的影响及变化规律,探索游离氨基酸在半滑舌鳎消化道胚后发育中的作用机制,为半滑舌鳎苗种培育提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 试验动物与饲养管理

本研究于2011年6~7月在山东海阳市黄海水产股份有限公司完成。试验用鱼为人工繁殖孵化的30d左右底栖初期、初始体长为 $1.67\pm 0.14\text{cm}$ 的半滑舌鳎稚鱼。

试验设4个处理组,分别投喂经蛋氨酸和裂壶藻及蛋氨酸+裂壶藻强化的卤虫,对照组投喂未经强化的卤虫。每个处理组设3个重复。试验鱼随机分配于12个直径1m、高1m的圆柱形养殖桶中,水位50cm左右,每桶600尾,暂养3d后正式开始试验。流水养殖,连续充气,每天投喂两次,分别为06:00和22:00,投喂量10个/ml,投喂时水位放至20cm左右并停水,投喂1h后流水。试验期间水温 $20\sim 22^{\circ}\text{C}$,溶氧 $6\sim 7\text{mg/L}$,海水比重 $1.019\sim 1.021$ 。

投喂试验鱼的卤虫均为强化16h的卤虫无节幼体。采用直接强化的方法将强化物质准确称量后通过300目筛绢直接溶于养殖水体中,对照组的卤虫不添加任何物质,强化密度为每ml水体100~200个卤虫。强化剂用量为蛋氨酸 5.3mmol/L 、裂壶藻 100g/m^3 。将各组卤虫用筛绢网过滤,冲洗后分别投喂给相应的半滑舌鳎稚鱼。

1.2 取样

试验进行16d,体长、体重、消化酶、胆囊收缩素(CCK)、甲状腺素(T₄)、三碘甲状腺原氨酸(T₃)及皮质醇指标的测定,每4d取样1次。清晨投喂前取样,测定体长、体重的样品,每个重复取样40尾,经麻醉(100mg/L MS-222)后测量体长,用蒸馏水冲洗鱼体表,吸干体表多余水分,40尾集中称重(Sartorius AG Germany 电子天平,精确至0.001g),取平均值作为一个体重数据。消化酶和激素的测定,各取样10尾,取样后迅速保存于液氮中。

1.3 测定指标及分析方法

1.3.1 酶液及激素液的制备

酶液:鱼苗剪取腹部,加入4倍体积的预冷重蒸水,使用小型电动匀浆器(Wiggens D-130)冰浴匀浆,然后置于冷冻离心机中 $0\sim 1^{\circ}\text{C}$ 、3000 r/min离心10min,取上清液用于各种消化酶的测定。酶液置于 4°C 冰箱保存备用,24h内分析完毕。酶液在测定时用预冷重蒸水稀释到10%。

激素液:鱼苗剪取腹部,加入1倍体积的 $1\times$ PBS预冷缓冲溶液,充分匀浆后放入冷冻离心机以 $5000\times g$ 离心5min,取上清液置于 4°C 冰箱内,24h内分析完毕。

1.3.2 消化酶的测定

碱性磷酸酶(AKP)、淀粉酶及蛋白含量的测定均使用南京建成生物工程研究所研制的试剂盒进行,碱性磷酸酶定义每g组织蛋白在 37°C 与基质作用15min产生1mg酚为1个酶活力单位。

淀粉酶定义组织中每mg蛋白在 37°C 与底物作用30min,水解10mg淀粉为1个淀粉酶活力单位。

酶液蛋白浓度的测定使用考马斯亮兰法,在595nm波长下测定光密度。

胃蛋白酶的测定:加入 37°C 预热2min的酶液 $100\mu\text{l}$,2%的预热酪蛋白溶液 $100\mu\text{l}$, 40°C 水浴反应10min,加入 0.4mol/L 的三氯乙酸 $200\mu\text{l}$ 终止反应,3000 r/min离心15min,取上清液 $30\mu\text{l}$,加入 0.4mol/L Na_2CO_3 $150\mu\text{l}$,加入福林试剂 $30\mu\text{l}$, 37°C 反应20min,用酶标仪在660nm波长下比色。对照组应在加入酪蛋白溶液前加入三氯乙酸终止反应。2%酪蛋白溶液使用pH 2.6的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液配制。定义在 37°C 下每min水解酪蛋白产生 $1\mu\text{g}$ 酪氨酸为1个蛋白酶活力单位。

类胰蛋白酶的测定:将磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液换成 pH 8.5 的 Tris-HCl 缓冲液,其余同胃蛋白酶的测定方法。

1.3.3 激素的测定

CCK、T4、T3 及皮质醇的测定:激素的测定均使用武汉华美生物工程有限公司生产的试剂盒进行,450nm 波长测定光密度。CCK 的测定采用鱼胆囊收缩素/肠促胰酶肽(CCK)酶联免疫试剂盒(CSB-E13054Fh, Cusabio, 中国),T3 测定采用鱼三碘甲状腺原氨酸(T3)检测试剂盒(E08488f, Cusabio, 中国),T4 使用鱼甲状腺素(T4)检测试剂盒(CSB-E08489f, Cusabio, 中国),皮质醇的检测使用鱼类皮质醇(Cortisol)酶联免疫试剂盒(CSB-E08487f, Cusabio, 中国)。

1.4 统计分析

试验结果经统计学软件 SPSS 16.0 处理,使用单因素方差分析(One-Way ANOVA),显著水平设为 $P < 0.05$,结果以平均数±标准差(Mean±SD)表示。

2 结果与分析

2.1 生长与成活率

试验结束时,4 个试验组的成活率均在 99% 以上,且差异不显著。

表 1 和表 2 分别显示了不同处理组在不同取样点的体长和体重数据。在 4 个取样点,对照组的体长始终处于较低水平,裂壶藻组始终处于最高水平,且在 12d 时裂壶藻组显著高于其他试验组($P < 0.05$),其他取样点的体长数据均没有显著差异($P > 0.05$)。

表 1 4 个试验组的半滑舌鲷仔稚鱼的平均体长(平均数±标准差)(cm)

Table 1 Average length of *C. semilaevis* Günther in four treatments (Mean±SD)(cm)

组 Treatment	4d	8d	12d	16d
蛋氨酸组 Methionine	1.95±0.05 ^a	2.18±0.03 ^a	2.47±0.21 ^a	2.74±0.08 ^a
裂壶藻组 <i>Schizochytrium</i>	1.96±0.04 ^a	2.21±0.08 ^a	2.55±0.26 ^b	2.85±0.02 ^a
蛋氨酸+裂壶藻组 Methionine+ <i>Schizochytrium</i>	1.94±0.04 ^a	2.20±0.03 ^a	2.45±0.20 ^a	2.79±0.03 ^a
对照组 Control	1.94±0.05 ^a	2.21±0.05 ^a	2.45±0.19 ^a	2.74±0.06 ^a

注:同列标有不同字母表示差异显著, $P < 0.05$

Note: Different letters in the same columns show statistically significant differences between values

由表 2 看出,用裂壶藻强化的卤虫无节幼体投喂,试验鱼获得了最好的生长,体重增长速度最快,在 16d 时显著高于对照组($P < 0.05$),与蛋氨酸组及蛋氨酸加裂壶藻组差异不显著,4、8、12d 时,4 个试验组之间无显著差异。由体长、体重数据看出,不同物质强化的卤虫无节幼体对试验鱼生长的促进作用依次为:裂壶藻组>蛋氨酸加裂壶藻组>蛋氨酸组>对照组。

表 2 4 个试验组的半滑舌鲷仔稚鱼的平均体重(平均数±标准差)(mg)

Table 2 Average weight of *C. semilaevis* Günther in four treatments(Mean±SD)(mg)

组 Treatment	4d	8d	12d	16d
蛋氨酸组 Methionine	41.75±2.14 ^a	55.58±3.17 ^a	74.00±4.12 ^a	95.66±11.19 ^{ab}
裂壶藻组 <i>Schizochytrium</i>	43.83±1.42 ^a	56.41±2.04 ^a	80.17±5.77 ^a	111.08±3.91 ^b
蛋氨酸+裂壶藻组 Methionine+ <i>Schizochytrium</i>	40.67±1.26 ^a	59.58±4.23 ^a	73.17±3.91 ^a	102.58±6.58 ^{ab}
对照组 Control	40.58±3.45 ^a	56.83±3.64 ^a	77.33±2.36 ^a	89.83±8.53 ^a

注:同表 1

Note: Same as in Table 1

2.2 消化酶活力

表 3~表 6 分别显示了不同处理组在不同取样点的淀粉酶、碱性磷酸酶、类胰蛋白酶和胃蛋白酶活力。

淀粉酶活力在不同试验组之间都遵循先降低再升高然后再降低的趋势(表 3)。蛋氨酸加裂壶藻组的淀粉酶活力始终处于较高水平,且在 12d 时显著高于蛋氨酸组($P < 0.05$),与裂壶藻组和对照组差异不显著。其他取样点均没有显著差异。

表 3 4 个试验组的半滑舌鳎仔稚鱼的淀粉酶活力(平均数±标准差)(U/mg prot)

Table 3 Activity of amylase in *C. semilaevis* Günther in four treatments (Mean±SD)(U/mg prot)

组 Treatment	4d	8d	12d	16d
蛋氨酸组 Methionine	2.01±0.23 ^a	1.49±0.11 ^a	1.61±0.30 ^a	1.38±0.26 ^a
裂壶藻组 <i>Schizochytrium</i>	1.73±0.003 ^a	1.39±0.15 ^a	1.75±0.05 ^{ab}	2.10±0.08 ^a
蛋氨酸+裂壶藻组 Methionine+ <i>Schizochytrium</i>	2.14±0.38 ^a	1.44±0.23 ^a	2.15±0.25 ^b	1.99±0.27 ^a
对照组 Control	1.62±0.19 ^a	1.33±0.04 ^a	1.77±0.12 ^{ab}	1.60±0.69 ^a

注:同表 1

Note: Same as in Table 1

表 4 4 个试验组的半滑舌鳎仔稚鱼的碱性磷酸酶活力(平均数±标准差)(U/g prot)

Table 4 Activity of alkaline phosphatase in *C. semilaevis* Günther in four treatments (Mean±SD)(U/g prot)

组 Treatment	4d	8d	12d	16d
蛋氨酸组 Methionine	284.75±37.49 ^a	203.70±15.10 ^a	190.83±43.86 ^a	148.04±22.35 ^a
裂壶藻组 <i>Schizochytrium</i>	278.86±4.31 ^a	206.25±1.60 ^a	183.10±42.94 ^a	262.03±25.60 ^b
蛋氨酸+裂壶藻组 Methionine+ <i>Schizochytrium</i>	190.21±61.53 ^a	194.68±10.42 ^a	198.72±34.40 ^a	214.16±30.73 ^{ab}
对照组 Control	254.19±58.68 ^a	197.78±16.61 ^a	149.96±39.58 ^a	166.70±21.93 ^a

注:同表 1

Note: Same as in Table 1

AKP 活力在裂壶藻组始终处于较高水平(表 4),且在 16d 时显著高于蛋氨酸组和对照组($P < 0.05$),与蛋氨酸加裂壶藻组差异不显著。其他取样点各组均没有显著差异。裂壶藻组和对照组碱性磷酸酶活力有先降低再升高的趋势,蛋氨酸组始终降低,而蛋氨酸加裂壶藻组却始终保持增高态势。

表 5 4 个试验组的半滑舌鳎仔稚鱼的类胰蛋白酶活力(平均数±标准差)(U/g prot)

Table 5 Activity of trypsin in *C. semilaevis* Günther in four treatments (Mean±SD)(U/g prot)

组 Treatment	4d	8d	12d	16d
蛋氨酸组 Methionine	30.13±1.58 ^a	28.05±5.50 ^a	4.69±2.39 ^a	9.05±6.93 ^a
裂壶藻组 <i>Schizochytrium</i>	62.76±18.10 ^a	24.17±11.60 ^a	3.23±3.05 ^a	32.51±2.81 ^b
蛋氨酸+裂壶藻组 Methionine+ <i>Schizochytrium</i>	28.39±10.06 ^a	23.37±1.46 ^a	2.20±1.55 ^a	17.10±5.97 ^a
对照组 Control	28.49±13.19 ^a	29.83±12.04 ^a	6.68±9.48 ^a	18.60±1.73 ^a

注:同表 1

Note: Same as in Table 1

由表 5 看出,在试验前期类胰蛋白酶活性较高,12d 时各组活性均下降到最低,16d 时活性又大幅度升高,尤其是裂壶藻组和蛋氨酸+裂壶藻。裂壶藻组的活力在 16d 时显著高于其他各组($P < 0.05$),其他取样点各组差异不显著。

表 6 4 个试验组的半滑舌鲷仔稚鱼的胃蛋白酶活力(平均数±标准差)(U/g prot)

Table 6 Activity of pepsin in *C. semilaevis* Günther in four treatments (Mean±SD)(U/g prot)

组 Treatment	4d	8d	12d	16d
蛋氨酸组 Methionine	32.01±20.43 ^a	29.26±13.35 ^a	24.16±4.25 ^a	14.93±5.63 ^a
裂壶藻组 <i>Schizochytrium</i>	28.46±13.56 ^a	20.42±2.81 ^a	19.86±6.49 ^a	23.59±10.54 ^a
蛋氨酸+裂壶藻组 Methionine+ <i>Schizochytrium</i>	40.54±8.16 ^a	24.70±3.44 ^a	26.94±15.18 ^a	24.11±5.89 ^a
对照组 Control	41.36±8.65 ^a	26.81±3.62 ^a	35.78±7.45 ^a	20.47±4.74 ^a

注:同表 1

Note: Same as in Table 1

表 6 显示了不同强化组在不同取样点的胃蛋白酶活力变化,可见蛋氨酸加裂壶藻组活力始终处于较高水平,但与其他组在 4 个取样点始终没有显著差异。

2.3 激素水平

表 7~表 10 分别显示了不同试验组在不同取样点时体内 CCK、T4、T3 及皮质醇的含量。

由表 7 看出,不同试验组的 CCK 含量基本保持持续升高的趋势,对照组含量始终处于最高水平,且在 4d 时显著高于蛋氨酸组及蛋氨酸加裂壶藻组($P<0.05$),12d 时显著高于其他 3 个组,16d 时显著高于裂壶藻组($P<0.05$)。

表 7 4 个试验组的半滑舌鲷仔稚鱼的 CCK 含量(平均数±标准差)(pg/g)

Table 7 Contents of cholecystokinin in *C. semilaevis* Günther in four treatments (Mean±SD)(pg/g)

组 Treatment	4d	8d	12d	16d
蛋氨酸组 Methionine	375.23±77.87 ^a	258.46±53.41 ^a	281.80±34.34 ^a	362.77±37.64 ^{ab}
裂壶藻组 <i>Schizochytrium</i>	422.84±66.25 ^{ab}	397.44±158.04 ^a	274.21±43.89 ^a	217.60±101.89 ^a
蛋氨酸+裂壶藻组 Methionine+ <i>Schizochytrium</i>	347.89±72.36 ^a	263.38±83.64 ^a	337.41±88.37 ^a	361.08±91.41 ^{ab}
对照组 Control	644.92±126.35 ^b	436.49±142.46 ^a	580.84±123.45 ^b	513.54±120.57 ^b

半滑舌鲷稚鱼体内 T4 含量在试验过程中始终保持升高趋势(表 8),裂壶藻组始终处于较高水平,且在 12d 时显著高于对照组($P<0.05$),与蛋氨酸组及蛋氨酸加裂壶藻组差异不显著。其他取样点均无显著差异。

表 8 4 个试验组的半滑舌鲷仔稚鱼的 T4 含量(平均数±标准差)(ng/larvae)

Table 8 Content of T4 in *C. semilaevis* Günther in four treatments (Mean±SD)(ng/larvae)

组 Treatment	4d	8d	12d	16d
蛋氨酸组 Methionine	1.17±0.05 ^a	1.54±0.08 ^a	2.07±0.31 ^{ab}	2.71±0.45 ^a
裂壶藻组 <i>Schizochytrium</i>	1.20±0.07 ^a	1.52±0.11 ^a	2.43±0.10 ^b	3.26±0.37 ^a
蛋氨酸+裂壶藻组 Methionine+ <i>Schizochytrium</i>	1.11±0.10 ^a	1.57±0.08 ^a	2.07±0.22 ^{ab}	3.24±0.62 ^a
对照组 Control	1.11±0.09 ^a	1.42±0.05 ^a	1.84±0.06 ^a	2.92±0.22 ^a

注:同表 1

Note: Same as in Table 1

表 9 显示了不同处理组的稚鱼在试验过程中,其体内 T3 含量始终保持增长的趋势。裂壶藻组始终保持较高的 T3 水平,且在 12d 时显著高于蛋氨酸组及对照组($P<0.05$),与蛋氨酸加裂壶藻组差异不显著。其他取样点均没有显著差异。

皮质醇含量在试验过程中也始终保持增高的趋势(表 10)。蛋氨酸组的皮质醇含量在 4d 时显著低于其他 3 个试验组($P < 0.05$), 8d 和 16d 时显著低于对照组及蛋氨酸加裂壶藻组($P < 0.05$), 与裂壶藻组差异不显著, 12d 时裂壶藻组含量较高, 4 个试验组无显著差异。

表 9 4 个试验组的半滑舌鳎仔稚鱼的 T3 含量(平均数±标准差)(pg/larvae)

Table 9 Content of T3 in *C. semilaevis* Günther in four treatments (Mean±SD)(pg/larvae)

组 Treatment	4d	8d	12d	16d
蛋氨酸组 Methionine	69.99±5.18 ^a	99.82±4.40 ^a	121.39±13.37 ^a	168.5±45.73 ^a
裂壶藻组 <i>Schizochytrium</i>	73.75±8.82 ^a	92.16±10.50 ^a	152.9±8.36 ^b	212.8±19.09 ^a
蛋氨酸+裂壶藻组 Methionine+ <i>Schizochytrium</i>	60.50±3.56 ^a	104.25±10.63 ^a	133.7±17.83 ^{ab}	203.6±37.79 ^a
对照组 Control	58.77±5.77 ^a	91.32±4.67 ^a	117.2±3.40 ^a	196.2±31.64 ^a

注: 同表 1

Note: Same as in Table 1

表 10 4 个试验组的半滑舌鳎仔稚鱼的皮质醇含量(平均数±标准差)(pg/larvae)

Table 10 Content of cortisol in *C. semilaevis* Günther in four treatments (Mean±SD)(pg/larvae)

组 Treatment	4d	8d	12d	16d
蛋氨酸组 Methionine	79.33±9.84 ^a	102.53±21.70 ^a	179.69±59.71 ^a	238.39±65.16 ^a
裂壶藻 <i>Schizochytrium</i>	121.58±11.84 ^b	161.15±53.17 ^{ab}	281.94±40.79 ^a	377.88±24.92 ^{ab}
蛋氨酸+裂壶藻组 Methionine+ <i>Schizochytrium</i>	126.55±13.85 ^b	208.90±34.80 ^b	276.11±41.39 ^a	462.26±52.06 ^b
对照组 Control	141.20±12.67 ^b	215.87±4.14 ^b	278.95±12.39 ^a	393.92±77.53 ^b

注: 同表 1

Note: Same as in Table 1

3 讨论

半滑舌鳎仔、稚鱼的分期参照万瑞景等(2004)对半滑舌鳎的形态观察及分期方法: 仔鱼期是指初孵仔鱼至冠状幼鳍鳍条出现; 稚鱼期指背臀鳍鳍条形成至眼睛移位完全。半滑舌鳎 3 日龄仔鱼就开始摄食外源营养物质(庄志猛等 2005), 其在仔稚鱼期需完成各器官的生长发育、色素的沉着及变形等, 需要适合其营养需求的食物供给来完成早期的生长和分化。

轮虫和卤虫无节幼体作为海水鱼早期发育阶段的活饵料, 较配合饲料而言, 很容易被仔稚鱼消化和吸收。塞内加尔鳎的仔稚鱼在投喂卤虫 24h 后, 吸收率达到 77%~83%(Conceição *et al.* 2007)。而且大部分吸收的营养物质在 3h 之内就用于合成蛋白质(Morais *et al.* 2004)。然而卤虫体内 FAA 含量不能满足鳎类苗种正常的生长需要(Aragao *et al.* 2004), 可能缺少组氨酸、赖氨酸, 含硫氨基酸、芳香族氨基酸、缬氨酸、苏氨酸和精氨酸中的一种或几种(Conceição *et al.* 2007; Aragao *et al.* 2004)。试验结果显示, 强化 Met 的卤虫无节幼体可以促进半滑舌鳎的生长、激素的分泌及消化酶活力, 但影响都不大, 这与 Naz 等(2009a)关于金头鳎 *Sparus aurata* 的研究结果一致, 可能说明卤虫无节幼体体内的 Met 含量基本上可以满足半滑舌鳎稚鱼的生长需求。

裂壶藻组的试验鱼在体重、碱性磷酸酶、类胰蛋白酶活力及 T3、T4 水平等方面都显著优于其他处理组, 说明投喂裂壶藻强化的卤虫能使半滑舌鳎稚鱼获得更快速的生长和发育, 其所含有的营养物质更能满足稚鱼的营养需求, 这可能是裂壶藻强化增加了卤虫体内脂肪酸的含量, 尤其是 n-3 系列(EPA 和 DHA)、n-6 系列(ARA)等海洋鱼类自身不能合成, 需要从食物中获取的必需饱和和脂肪酸。它们对于仔稚鱼的色素沉着、眼睛移位等都有重要的生理功能。Reitan 等(1994)认为, 食物中的高 DHA 含量能保证大菱鲆 *Scophthalmus*

maximus 仔鱼的正常色素沉着,且不能由 EPA 来代替。Copeman 等(2002)也认为美洲黄盖鲽 *Limanda ferruginea* 需要供给足够 DHA 的食物来保证最大生长和成活率,而高含量的 ARA 对色素沉着有负面影响。

裂壶藻脂肪含量很高,能达到 56%,含有丰富的多不饱和脂肪酸,其 ARA 和 EPA 的含量分别为 0.168 9%和 0.194 5%,DHA 含量占总脂肪酸的 42.3%,且用裂壶藻强化的卤虫无节幼体其体内 DHA 含量能达到 1.5%(陈家鑫 2002),其作为磷脂前体物可能改变了卤虫体内磷脂的含量。食物中的磷脂可以促进早期海水鱼类的生长和存活率(Kanazawa *et al.* 1985; Geurden *et al.* 1995),还能提高采食量(Koven *et al.* 1998),作为肠道乳化剂,刺激肠上皮细胞中脂蛋白的合成等(Fontagné *et al.* 1998)。同时,磷脂等含磷的底物是 AKP 的刺激物(Shirazi *et al.* 1978; McCarthy *et al.* 1980),裂壶藻组及蛋氨酸加裂壶藻组稚鱼 AKP 活力较高,可能与裂壶藻的强化增加了卤虫体内 DHA 含量有关,从而改变了其体内磷脂的含量,刺激了 AKP 的分泌。T3、T4 与 AKP 趋势相近,可能是由于裂壶藻中的糖(13%~14%)(Warner *et al.* 1972)刺激了 T4 的分泌,而其中的氨基酸成分又刺激了单脱碘酶的活性(Riley *et al.* 1993),从而加速了 T4 脱碘转化为 T3。同时,T3 的浓度对 AKP 的基因表达有正向调节作用(Malo *et al.* 2004; 田娟等 2011)。可能也是改变裂壶藻组 AKP 活性的重要因素。高水平的 T3 和 T4 促进了试验鱼的新陈代谢和生长发育,这是内分泌系统与消化系统相互作用的结果。

CCK 的分泌受到食物中部分消化产物的影响,如二肽、三肽、一些蛋白质消化的终极产物如色氨酸和苯丙氨酸(俞国乔 1997)以及赖氨酸(Naz *et al.* 2009b)等都是强有力的刺激物。另外,碳水化合物对 CCK 的分泌也有一定的刺激作用(Liddle 2000)。对照组在 4d 时 CCK 含量较高,之后 4 个组无显著差异,说明食物中高含量的 Met 不能刺激机体产生 CCK。淀粉酶活力受食物中糖含量及机体内 CCK 的影响,而蛋氨酸加裂壶藻组的淀粉酶活力较高,具体的作用机理还不清楚,有待于进一步研究。

皮质醇是一种糖皮质激素兼盐皮质激素,在鱼类发育早期阶段,除了作用于基本的新陈代谢和渗透调节之外(Deane *et al.* 2003),还与甲状腺素存在协同作用,促进肠道的发育,并且对于仔稚鱼成活率(Sampath-Kumar *et al.* 1993)和生长发育(Mathiyalagan *et al.* 1996)有重要的促进作用。Met 组的皮质醇激素含量始终处于较低水平,具体原因还有待进一步研究。

参 考 文 献

- 万瑞景,姜言伟,庄志猛. 2004. 半滑舌鲷早期形态及发育特征. 动物学报, 50(1): 91~102
- 马静,邹安革,王新星,常青,滕玉清,王文斌. 2012. 不同强化物质对卤虫体内游离氨基酸含量的影响. 渔业科学进展, 33(1):102~108
- 田娟,施志仪. 2011. 碱性磷酸酶在大菱鲆不同组织的表达及其与甲状腺素的关系. 中国水产科学, 18(1): 208~213
- 庄志猛,万瑞景,陈省平,刘新富. 2005. 半滑舌鲷仔鱼的摄食与生长. 动物学报, 51(6):1 023~1 033
- 刘镜恪. 2003. 海水仔稚鱼早期阶段氨基酸的营养生理研究进展. 海洋水产研究, 24(1):75~79
- 陈家鑫. 2002. 裂壶藻及其制品在水产苗种培育中的应用. 科学养鱼, (6): 53~53
- 俞国乔. 1997. 胆囊收缩素的生物学功能及在动物中应用的研究进展. 浙江畜牧兽医, (4): 15~16
- 常青,张秀梅,陈四清,梁萌青,刘寿堂. 2005. 半滑舌鲷仔稚鱼消化酶活性的变化. 海洋科学进展, 23(4):472~476
- Aragao, C., Conceicao, L. E. C., Fyhn, H. J., and Teresa Dinis, M. 2004. Estimated amino acid requirements during early ontogeny in fish with different life styles; gilthead seabream (*Sparus aurata*) and Senegalese sole (*Solea senegalensis*). Aquaculture, 242(1-4): 589~605
- Bell, J. G., McEvoy, L. A., Estevez, A., Shields, R. J., and Sargent, J. R. 2003. Optimising lipid nutrition in first-feeding flatfish larvae. Aquaculture, 227(1-4): 211~220
- Conceição, L. E. C., Ribeiro, L., Engrola, S., Aragão, C., Morais, S., Lacuisse, M., Soares, F., and Dinis, M. T. 2007. Nutritional physiology during development of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). Aquaculture, 268(1-4): 64~81
- Copeman, L., Parrish, C., Brown, J., and Harel, M. 2002. Effects of docosahexaenoic, eicosapentaenoic, and arachidonic acids on the early growth, survival, lipid composition and pigmentation of yellowtail flounder (*Limanda ferruginea*): a live food enrichment experiment. Aquaculture, 210(1-4): 285~304
- Deane, E. E., and Woo, N. 2003. Ontogeny of thyroid hormones, cortisol, hsp70 and hsp90 during silver sea bream larval development. Life Sciences, 72(7): 805~818
- Finn, R. N., Rønnestad, I., Van Der Meer, T., and Fyhn, H. J. 2002. Fuel and metabolic scaling during the early life stages of Atlantic cod

- Gadus morhua*. Marine Ecology Progress Series, 243: 217~234
- Fontagné, S., Geurden, I., Escaffre, A. M., and Bergot, P. 1998. Histological changes induced by dietary phospholipids in intestine and liver of common carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae. Aquaculture, 161(1-4): 213~223
- Geurden, I., Radünz-Neto, J., and Bergot, P. 1995. Essentiality of dietary phospholipids for carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae. Aquaculture, 131(3-4):303~314
- Helland, S., Terjesen, B. F., and Berg, L. 2003. Free amino acid and protein content in the planktonic copepod *Temora longicornis* compared to *Artemia franciscana*. Aquaculture, 215(1-4): 213~228
- Helland, S., Triantaphyllidis, G., Fyhn, H., Evjen, M., Lavens, P., and Sorgeloos, P. 2000. Modulation of the free amino acid pool and protein content in populations of the brine shrimp *Artemia* spp. Marine Biology, 137(5-6): 1 005~1 016
- Kanazawa, A., Teshima, S. I., and Sakamoto, M. 1985. Effects of dietary lipids, fatty acids, and phospholipids on growth and survival of prawn (*Penaeus japonicus*) larvae. Aquaculture, 50(1-2): 39~49
- Koven, W. M., Parra, G., and Tandler, A. 1998. The effect of dietary phosphatidylcholine and its constituent fatty acids on microdiet ingestion and fatty acid absorption rate in gilthead sea bream, *Sparus auratus*, larvae. Aquaculture Nutrition, 4(1): 39~46
- Liddle, R. A. 2000. Regulation of cholecystokinin secretion in humans. Journal of Gastroenterology, 35(3): 181~187
- Malo, M. S., Zhang, W., Alkhoury, F., Pushpakaran, P., Abedrapo, M. A., Mozumder, M., Fleming, E., Siddique, A., Henderson, J. W., and Hodin, R. A. 2004. Thyroid hormone positively regulates the enterocyte differentiation marker intestinal alkaline phosphatase gene via an atypical response element. Molecular Endocrinology, 18(8): 1941~1962
- Mathiyalagan, A., Reddy, P., and Lam, T. J. 1996. Effects of cortisol on growth and development in tilapia larvae, *Oreochromis mossambicus*. Fish Physiology and Biochemistry, 15(6): 453~458
- McCarthy, D., Nicholson, J., and Kim, Y. S. 1980. Intestinal enzyme adaptation to normal diets of different composition. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 239(6): 445~451
- Morais, S., Lacuisse, M., Conceição, L. E. C., Dinis, M., and Rønnestad, I. 2004. Ontogeny of the digestive capacity of Senegalese sole (*Solea senegalensis*), with respect to digestion, absorption and metabolism of amino acids from *Artemia*. Marine Biology, 145(2): 243~250
- Næss, T., and Lie, Ø. 1998. A sensitive period during first feeding for the determination of pigmentation pattern in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L., juveniles: the role of diet. Aquaculture Research, 29(12):925~934
- Naz, M., and Türkmen, M. 2009a. The changes in digestive enzymes and hormones of gilthead seabream larvae (*Sparus aurata*, L. 1758) fed on *Artemia* nauplii enriched with free methionine. Aquaculture International, 17(3):243~256
- Naz, M., and Türkmen, M. 2009b. Changes in the digestive enzymes and hormones of gilthead seabream larvae (*Sparus aurata*, L. 1758) fed on *Artemia* nauplii enriched with free lysine. Aquaculture International, 17(6):523~535
- Næss, T., Germain-Henry, M., and Naas, K. E. 1995. First feeding of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) using different combinations of *Artemia* and wild zooplankton. Aquaculture, 130(2-3): 235~250
- Riley Jr, W., Higgs, D. A., Dosanjh, B. S., and Eales, J. G. 1993. Influence of dietary amino acid composition on thyroid function of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture, 112(2-3):253~269
- Rønnestad, I., and Fyhn, H. J. 1993. Metabolic aspects of free amino acids in developing marine fish eggs and larvae. Reviews in Fisheries Science, 1(3): 239~259
- Reitan, K. I., Rainuzzo, J. R., and Olsen, Y. 1994. Influence of lipid composition of live feed on growth, survival and pigmentation of turbot larvae. Aquaculture International, 2(1): 33~48
- Sampath-Kumar, R., Munro, A., Lee, J., and Lam, T. J. 1993. Exogenous cortisol promotes survival of Asian seabass (*Lates calcarifer*) hatchlings exposed to hypersalinity but not hyposalinity shock. Aquaculture, 116(2): 247~255
- Shields, R. J., Bell, J. G., Luizi, F. S., Gara, B., Bromage, N. R., and Sargent, J. R. 1999. Natural copepods are superior to enriched *Artemia* nauplii as feed for halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus*) in terms of survival, pigmentation and retinal morphology: relation to dietary essential fatty acids. The Journal of Nutrition, 129(6):1 186~1 194
- Shirazi, S., Colston, K., and Butterworth, P. J. 1978. Alkaline phosphatase: a possible transport protein for inorganic phosphate. Biochemical Society Transactions, 6(5): 933
- Tonheim, S., Koven, W., and Rønnestad, I. 2000. Enrichment of *Artemia* with free methionine. Aquaculture, 190(3-4): 223~235
- Warner, A. H., Puodziukas, J. G., and Finamore, F. J. 1972. Yolk platelets in brine shrimp embryos: Site of biosynthesis and storage of the diguanosine nucleotides. Experimental Cell Research, 70(2): 365~375