

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200920001

http://www.yykxjz.cn/

王尧, 陈晨光, 张洁若, 高煜杰. 养殖密度对厚颌鲂幼鱼生长、饲料利用及肠道抗氧化应激性能的影响. 渔业科学进展, 2022, 43(1): 106–114

WANG Y, CHEN C G, ZHANG J R, GAO Y J. Effects of stocking density on growth, feed utilization and intestinal oxidative stress resistance in juvenile *Megalobrama pellegrini* (Tchang, 1930). Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(1): 106–114

养殖密度对厚颌鲂幼鱼生长、饲料利用 及肠道抗氧化应激性能的影响*

王尧 陈晨光 张洁若 高煜杰^①

(海南大学海洋学院 海南 海口 570228)

摘要 本研究拟通过养殖实验确定厚颌鲂(*Megalobrama pellegrini*)幼鱼最适养殖密度;同时,利用酶学和分子生物学手段分析养殖密度对厚颌鲂幼鱼肠道抗氧化酶活性及氧化应激相关基因表达的影响。实验设计5个密度处理组,分别为0.15 kg/m³(50尾/桶)、0.24 kg/m³(80尾/桶)、0.34 kg/m³(110尾/桶)、0.42 kg/m³(140尾/桶)和0.50 kg/m³(170尾/桶),每组设置3个平行,实验周期为42 d。结果显示,当养殖密度从0.15 kg/m³逐渐升高到0.50 kg/m³时,厚颌鲂幼鱼生长(增重率和特定生长率)呈先上升后下降的趋势,且在最大密度时(0.50 kg/m³)增重率和特定生长率显著低于0.34 kg/m³密度实验组($P<0.05$)。同时,最高养殖密度处理组(0.50 kg/m³)饲料系数显著高于中低密度实验组(0.15、0.24和0.34 kg/m³)($P<0.05$),说明过高养殖密度不利于厚颌鲂幼鱼的生长和饲料利用。实验表明,提高养殖密度并未影响厚颌鲂幼鱼成活率($P>0.05$),各组存活率均较高(>97%)。当养殖密度为0.34 kg/m³时,厚颌鲂幼鱼全鱼粗蛋白和粗脂肪含量显著高于其他各密度实验组($P<0.05$)。厚颌鲂幼鱼肠道抗氧化应激相关指标受到养殖密度的显著影响,其中,0.24和0.34 kg/m³密度处理组鱼体肠道总抗氧化能力显著高于最低密度组(0.15 kg/m³)和高密度组(0.42、0.50 kg/m³)($P<0.05$);最高密度实验组(0.50 kg/m³)肠道超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性最低,而丙二醛(MDA)含量最高($P<0.05$);谷胱甘肽(GSH)含量最高值出现在0.34 kg/m³处理组,显著高于其他各实验组($P<0.05$)。最低密度实验组(0.15 kg/m³)厚颌鲂幼鱼肠道细胞色素P450(CYP1A)基因相对表达量显著低于较高密度实验组(0.42 kg/m³)($P<0.05$);最高养殖密度组(0.50 kg/m³)鱼体肠道转录因子NF-E2相关因子2(Nrf2)基因相对表达量最高,而锰超氧化物歧化酶基因(MnSOD)相对表达量最低,与0.34 kg/m³密度处理组间有显著性差异($P<0.05$),说明养殖密度过高时能引起鱼体的氧化应激反应。研究表明,体重为0.45~1.36 g的厚颌鲂幼鱼最适养殖密度为0.34 kg/m³,该结果可为提高厚颌鲂苗种培育效率,促进其种质资源恢复提供理论基础。

关键词 厚颌鲂; 养殖密度; 生长; 饲料利用; 肠道氧化应激

中图分类号 S917.4 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2022)01-0106-09

* 海南大学科研启动项目(KYQD1718)资助 [This work was supported by Research Fund Project of Hainan University (KYQD1718)]. 王尧, E-mail: 849236490@qq.com

^① 通讯作者: 高煜杰, 副教授, E-mail: yujiégao@hotmail.com

收稿日期: 2020-09-20, 收修改稿日期: 2020-10-20

厚颌鲂(*Megalobrama pellegrini*)俗称乌鳊, 属鲤形目(Cypriniformes)、鲤科(Cyprinidae)、鲃亚科(Culterinae)、鲂属(*Megalobrama*), 主要分布在长江上游干流及乌江、岷江、赤水河、沱江、嘉陵江等支流的中下游, 是我国长江上游地区具有较高经济价值的鱼类之一(李文静等, 2007)。然而, 由于栖息地的破坏以及过度捕捞等人为因素的影响, 导致其种群数量急剧减少, 现属于三级保护物种(刘军, 2004)。目前, 虽已能够进行厚颌鲂的人工繁育, 但其相关研究工作开展较晚, 缺乏对其养殖模式的探究, 因此, 也限制了其种质资源的有效恢复以及此优良品种的快速发展。

集约化养殖已逐步成为我国渔业生产的主要方式, 极大促进了我国水产养殖业的快速发展。而其中养殖密度是集约化养殖生产过程中最基本的生产管理要素, 增加养殖密度也是提高单位水体产量的常用方法。然而, 养殖密度过高, 将对鱼类生长产生负面影响, 同时造成水体环境恶化, 从而增大养殖风险(张晓等, 2020)。在多数常见鱼类研究中如大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)(乔玮等, 2014)、施氏鲟(*Acipenser schrenckii*)(任源远等, 2014)、团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)(亓成龙, 2016)、瓦氏黄颡鱼(*Pelteobagrus vachelli*)(姚清华等, 2018)和罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)(肖炜等, 2019)均发现养殖密度过高会抑制鱼体的正常生长。此外, 养殖密度引起的生理压力会导致鱼体产生氧化应激, 加快活性氧(ROS)的产生, 并对动物体内细胞结构产生损伤, 从而危害鱼体健康。同时, 也会消耗参与组成抗氧化系统的某些维生素和矿物元素, 导致必需营养元素的缺乏(Costas *et al.*, 2013)。而机体内由超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽酶系(GR、GSH-Px、GST)组成的抗氧化体系能够清除体内多余自由基, 从而保证机体健康。而非酶系统中热休克蛋白(HSP)及谷胱甘肽(GSH)等小分子物质, 可保护蛋白质等分子物质免受自由基诱导的损害(Limon-Pacheco *et al.*, 2009)。研究显示, 养殖密度过高时鱼体内抗氧化酶活性(SOD, GSH-Px)减弱, 抗氧化能力降低, 而脂质过氧化产物(丙二醛)和应激反应代谢产物(葡萄糖、乳酸和皮质醇)升高(张龙等, 2019)。但对于有些鱼类而言, 养殖密度过低不利于其集群行为的发生, 因而也会影响鱼体生长, 且较低的养殖密度也限制了资源的有效利用, 减少养殖收益(Millancubillo *et al.*, 2016)。由此可见, 适宜的养殖密度对养殖鱼类生长和健康至关重要。

因此, 本文以厚颌鲂幼鱼为研究对象, 探究养殖

密度对其生长性能、鱼体组成和抗应激性能的影响, 以期为提高厚颌鲂幼鱼苗种培育效率、恢复其种质资源提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料与实验设计

实验用厚颌鲂幼鱼由金沙江珍稀特有鱼类增殖放流站繁育, 挑选健康活泼、规格相近的个体 1620 尾, 初始平均体重为(0.45±0.01) g, 体长为(3.10±0.02) cm, 分别置于 15 个玻璃纤维缸(直径为 50 cm, 高度为 75 cm)中。实验共设计 5 个密度梯度组, 分别为 0.15 kg/m³(50 尾/桶)、0.24 kg/m³(80 尾/桶)、0.34 kg/m³(110 尾/桶)、0.42 kg/m³(140 尾/桶)和 0.50 kg/m³(170 尾/桶), 每个处理组设置 3 个平行, 开展为期 42 d 的养殖实验。实验期间每天投喂鱼体体重为 5% 的商品饲料(四川通威, 粗蛋白为 33%, 粗脂肪为 4%), 分别于 09:00 和 16:30 进行投喂。采用流水养殖, 水温为(26.0±0.5)°C, 溶解氧(DO)为(6.02±0.20) mg/L。

1.2 样品采集

42 d 养殖实验结束后, 所有实验鱼饥饿 24 h, 统计每个养殖缸中鱼体终末体重、尾数及投喂饲料总量, 并依据以下公式计算相关指标:

$$\text{增重率(WG, \%)}=100\times(W_2-W_1)/W_1;$$

$$\text{特定生长率(SGR, \% / d)}=100\times(\ln W_2-\ln W_1)/(t_2-t_1);$$

$$\text{饲料系数(FCR)}=F/[n(W_2-W_1)];$$

$$\text{成活率(SR, \%)}=\text{终末尾数}/\text{初始尾数}\times 100\%。$$

式中, n 为尾数, F 为总投饵量(g), W_1 、 W_2 为初始时间(t_1)和实验结束(t_2)时鱼体体重(g)。

每个实验缸随机选取 11 尾鱼, 用 MS-222 将其麻醉, 从中选取 5 尾鱼用于全鱼组分分析; 取 6 尾鱼解剖得到肠道样品, 立即置于液氮中用于后续酶活分析和 RNA 提取。

1.3 体成分分析

水分含量: 将全鱼样品放置在 105°C 烘箱中并按照减重法进行水分测定及计算(GB/T9695.15-2008); 粗蛋白含量: 利用杜马斯燃烧法快速定氮仪(Elementar, 德国)(AOAC, 2005)进行测定; 粗脂肪含量: 利用脂肪抽提仪(海能 SOX406, 中国)有机溶剂抽提法(石油醚, 沸程为 60°C~90°C)进行粗脂肪测定(GB/T14772-2008)。

1.4 肠道氧化应激相关指标测定

肠道粗提液的制备: 准确称取肠道样本并记录,

与 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液按照质量体积比 1 : 9 混合, 进行冰浴匀浆, 4℃ 12,000 r/min 离心 15 min, 收集上清液转到新的离心管, 置于-80℃冰箱保存待测。总蛋白含量测定利用 BCA 微板法; 超氧化物歧化酶(SOD)活性利用 WST-8 法测定; 总抗氧化能力(T-AOC)利用 ABTS 法; 丙二醛(MDA)含量利用硫代巴比妥酸法测定; 还原性谷胱甘肽(GSH)含量利用 DTNB 微板法测定。其中, 过氧化氢酶(CAT)活性和 MDA 含量测定采用碧云天试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司), 其他 3 种酶的测定均采用南京建成试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

1.5 肠道氧化应激相关基因表达分析

利用 Trizol 试剂法(Invitrogen, 美国)提取厚颌鲂肠道总 RNA, 用 1.0%琼脂糖凝胶电泳检验 RNA 完整性, 参照反转录试剂盒(PrimeScript RT Master Mix, TaKaRa)说明书, 将 RNA 反转录为 cDNA。在荧光定量 PCR 仪(QuantStudio 6 Flex, Applied Biosystems, 新加坡)上进行实时荧光定量 PCR (qPCR)测定, 该实验反应总体系为 10 μ L, 包括 5 μ L TB Green Premix Ex Taq (TaKaRa, 大连), 各 0.2 μ L 正反引物(10 μ mol/L), 4.1 μ L 无核酶 DEPC 水和 0.5 μ L cDNA。qPCR 反应程序如下: 95℃, 10 min; 95℃, 15 s, 56℃, 60 s, 40 个循环; 70℃, 20 s。引物序列根据 NCBI 上鱼类相关目的基因序列用 Premier 5.0 设计, 验证正确后使用, 详见表 1。在每个 PCR 反应最后, 扩增产物的溶解曲线表明这些反应均是单一产物。标准曲线采用 8 个不同稀释浓度(每个 3 个平行), 扩增效率根据 $E=10^{(-1/\text{slope})}-1$ 计算。目的基因表达水平由 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算。

1.6 数据统计分析

数据用平均值 \pm 标准误(Mean \pm SE)表示, 采用 SPSS 20.0 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA)和 Tukey's 多重检验, $P<0.05$ 为差异显著。

表 1 实时荧光定量基因表达引物序列

Tab. 1 Primers used for real-time quantitative RT-PCR (qPCR)

基因名称 Gene name	基因序列编号 Gene sequence number	引物序列(5'~3') Primer sequence
<i>Cyp1A</i>	DQ517445.1	F: GTCCTGGGCTGTCGTCTATC R: TGGTGAAGGGAAGGAAGGAG
<i>MnSOD</i>	KF195932.1	F: GGTGATGTGACGACCCAAGT R: GAAATGAGCCAAAGTCACGC
<i>HSP90</i>	KM201321.1	F: TGCAAGAGAGGTTTCGAGGT R: GCCTGTTTGATACGGTGACC
<i>Nrf2</i>	JX462955.1	F: CGCGACTGGTTAGGACACA R: GCAGTACGTTTGTTCTATCT

2 实验结果

2.1 养殖密度对厚颌鲂幼鱼生长、饲料利用及成活率的影响

如表 2 所示, 厚颌鲂幼鱼生长(末平均体重、增重率和特定生长率)随着养殖密度的逐渐增大呈先上升后下降的趋势。鱼类增重率和特定生长率在密度为 0.34 kg/m³ 时最高, 显著高于最高密度处理组(0.5 kg/m³) ($P<0.05$), 但与其他密度处理组间无显著差异($P>0.05$)。饲料系数在 0.5 kg/m³ 密度处理组时最高, 显著高于 0.15、0.24 和 0.34 kg/m³ 密度处理组($P<0.05$), 其他各组间饲料系数差异不显著($P>0.05$)。提高养殖密度并没有造成养殖鱼成活率降低, 实验各组存活率均较高, 差异不显著($P>0.05$)。

2.2 全鱼体成分指标

厚颌鲂幼鱼体组成受到养殖密度的显著影响(表 3)。随着养殖密度的逐渐升高, 鱼体体组成呈现出先上升而后下降的趋势。当养殖密度为 0.34 kg/m³ 时, 厚颌鲂幼鱼全鱼粗蛋白和粗脂肪含量显著高于其

表 2 养殖密度对厚颌鲂幼鱼生长及饲料利用的影响

Tab. 2 Effects of stocking density on growth and feed utilization of juvenile *M. pellegrini*

项目 Items	养殖密度 Stocking density/(kg·m ⁻³)				
	0.15	0.24	0.34	0.42	0.50
初始平均体重 Initial body weight /g	0.45 \pm 0.01	0.45 \pm 0	0.46 \pm 0	0.45 \pm 0	0.44 \pm 0.01
终末平均体重 Final body weight /g	1.24 \pm 0.02 ^b	1.28 \pm 0.05 ^{ab}	1.36 \pm 0.04 ^a	1.22 \pm 0.03 ^b	1.09 \pm 0.02 ^c
增重率 Weight gain rate/%	177.6 \pm 9.1 ^a	184.1 \pm 12.4 ^a	196.4 \pm 9.2 ^a	169.1 \pm 9.7 ^{ab}	146.9 \pm 7.5 ^b
特定生长率 Specific growth rate/%	2.43 \pm 0.08 ^a	2.48 \pm 0.11 ^a	2.58 \pm 0.07 ^a	2.35 \pm 0.09 ^{ab}	2.15 \pm 0.07 ^b
饲料系数 Feed convection rate	1.47 \pm 0.09 ^b	1.41 \pm 0.11 ^b	1.30 \pm 0.06 ^b	1.51 \pm 0.09 ^{ab}	1.79 \pm 0.10 ^a
成活率 Survival rate /%	98.0 \pm 1.15	97.9 \pm 1.10	99.1 \pm 0.52	99.1 \pm 0.63	97.5 \pm 1.68

注: 同一行数字不同的字母上标表示组间有显著差异($P<0.05$), 下同

Note: Data with different superscripts in each row are significantly different ($P<0.05$). The same as below

他各实验组($P<0.05$), 而最高密度处理组(0.5 kg/m^3)全鱼粗蛋白和粗脂肪含量显著低于其他各实验组($P<0.05$)。

2.3 肠道抗氧化酶活性相关指标

如表 4 所示, 厚颌鲂幼鱼肠道抗氧化酶相关指标受到养殖密度的显著影响。其中, 低密度组(0.15 kg/m^3)和高密度组(0.42 和 0.50 kg/m^3)鱼体肠道总抗氧化能力显著低于 0.24 和 0.34 kg/m^3 密度处理组($P<0.05$)。

肠道 SOD 和 CAT 活性随养殖密度增大呈显著降低的趋势, 养殖密度为 0.50 kg/m^3 时, 肠道 SOD 和 CAT 活性最低, 且显著低于其他各处理组($P<0.05$)。GSH 含量随着养殖密度增大呈先上升后下降的趋势, 最高值出现在 0.34 kg/m^3 处理组, 且显著高于其他各实验组($P<0.05$)。最高养殖密度组(0.50 kg/m^3)肠道 MDA 含量显著高于其他各处理组($P<0.05$), 而 0.24 kg/m^3 密度组鱼体肠道 MDA 含量最低, 并显著低于其他各处理组($P<0.05$)。

表 3 养殖密度对厚颌鲂幼鱼全鱼体成分的影响

Tab. 3 Effects of stocking density on whole-body composition of juvenile *M. pellegrini*

全鱼体成分 Whole-body composition	养殖密度 Stocking density /($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$)				
	0.15	0.24	0.34	0.42	0.5
水分 Moisture /%	72.49±0.01 ^{bc}	72.98±0.03 ^{ab}	73.55±0.01 ^a	72.19±0.01 ^c	72.38±0.01 ^{bc}
粗蛋白 Crude protein /%	15.80±0.07 ^c	15.96±0.02 ^b	16.06±0.03 ^a	15.56±0.06 ^d	15.24±0.04 ^e
粗脂肪 Crude fat /%	8.60±0.04 ^c	9.56±0.05 ^b	10.69±0.05 ^a	7.98±0.01 ^d	6.73±0.02 ^e

表 4 养殖密度对厚颌鲂幼鱼肠道抗氧化酶活性的影响

Tab. 4 Effects of stocking density on intestinal antioxidant enzymes activities of juvenile *M. pellegrini*

抗氧化酶活性 Antioxidant enzymes activity	养殖密度 Stocking density /($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$)				
	0.15	0.24	0.34	0.42	0.5
总抗氧化能力 T-AOC /($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$)	4.67±0.08 ^c	6.68±0.14 ^a	5.69±0.06 ^b	3.50±0.04 ^d	4.69±0.03 ^c
超氧化物歧化酶 SOD /($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$)	121.3±0.10 ^a	120.6±0.08 ^b	120.7±0.04 ^b	116.6±0.12 ^c	112.3±0.11 ^d
还原型谷胱甘肽 GSH /($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$)	44.09±0.01 ^d	51.40±0.12 ^b	52.21±0.04 ^a	51.34±0.05 ^b	50.53±0.07 ^c
过氧化氢酶 CAT /($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$)	34.69±0.37 ^a	33.36±0.44 ^{ab}	32.28±0.37 ^{bc}	30.98±0.34 ^{cd}	29.93±0.41 ^d
丙二醛 MDA /($\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$)	4.63±0.09 ^c	4.25±0.04 ^d	5.16±0.02 ^b	4.78±0.09 ^c	5.71±0.08 ^a

2.4 肠道氧化应激相关基因表达

如图 1 所示, 厚颌鲂幼鱼肠道 *Hsp90* 基因表达在各密度处理组间无显著差异($P>0.05$)。 *CYP1A* 基因表达随养殖密度增大有升高趋势, 其中, 最低密度实验组(0.15 kg/m^3)厚颌鲂幼鱼肠道 *CYP1A* 基因表达最低, 且与 0.42 kg/m^3 实验组间有显著性差异($P<0.05$), 其他各处理组间无显著性差异($P>0.05$)。最高养殖密度组(0.50 kg/m^3)鱼体肠道 *Nrf2* 基因表达水平最高, 显著高于 0.15 和 0.34 kg/m^3 密度处理组; 而鱼体肠道 *MnSOD* 基因表达在最高养殖密度组(0.50 kg/m^3)显著低于适中养殖密度组(0.34 kg/m^3)。

3 讨论

适宜的养殖密度对鱼类早期生长及存活起到至关重要的作用, 同时, 也是提高水产养殖生产收益的重要方式。结果显示, 过高的养殖密度(0.50 kg/m^3)会显著抑制厚颌鲂幼鱼生长, 而适宜养殖密度

(0.34 kg/m^3)条件下鱼体增重率达到最大值。同样, 在大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)(倪金金等, 2020)、罗非鱼(左腾等, 2019)、塞内加尔舌鳎(*Solea senegalensis*)(Andrade *et al*, 2015)及斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)(Refaey *et al*, 2018)等鱼类的研究中均发现, 养殖密度过高时会显著抑制鱼体生长。刘群等(2014)认为, 高密度养殖条件对鱼体造成的应激效益会提高其对能量的消耗以及分配利用, 从而干扰鱼类正常生理状态, 进而对生长产生不利影响。然而, 在石首鱼(*Argyrosomus japonicus*)中的研究发现, 提高养殖密度能够促进鱼体生长, 低密度情况下反而会抑制鱼体生长(Pirozzi *et al*, 2009; Millancubillo *et al*, 2016)。同样, 银鲳(*Pampus argenteus*)幼鱼在低密度养殖条件下生长显著低于中密度组, 表明群居习性鱼类在过低养殖密度时不利于其生长(倪嘉豪等, 2020)。以上研究表明, 养殖密度对鱼体生长的影响与种类、生长阶段、实验设计以及养殖条件密切相关。因此, 有必要研究和确定养殖对象的最适养殖密度, 从而提高养殖效率提供依据。

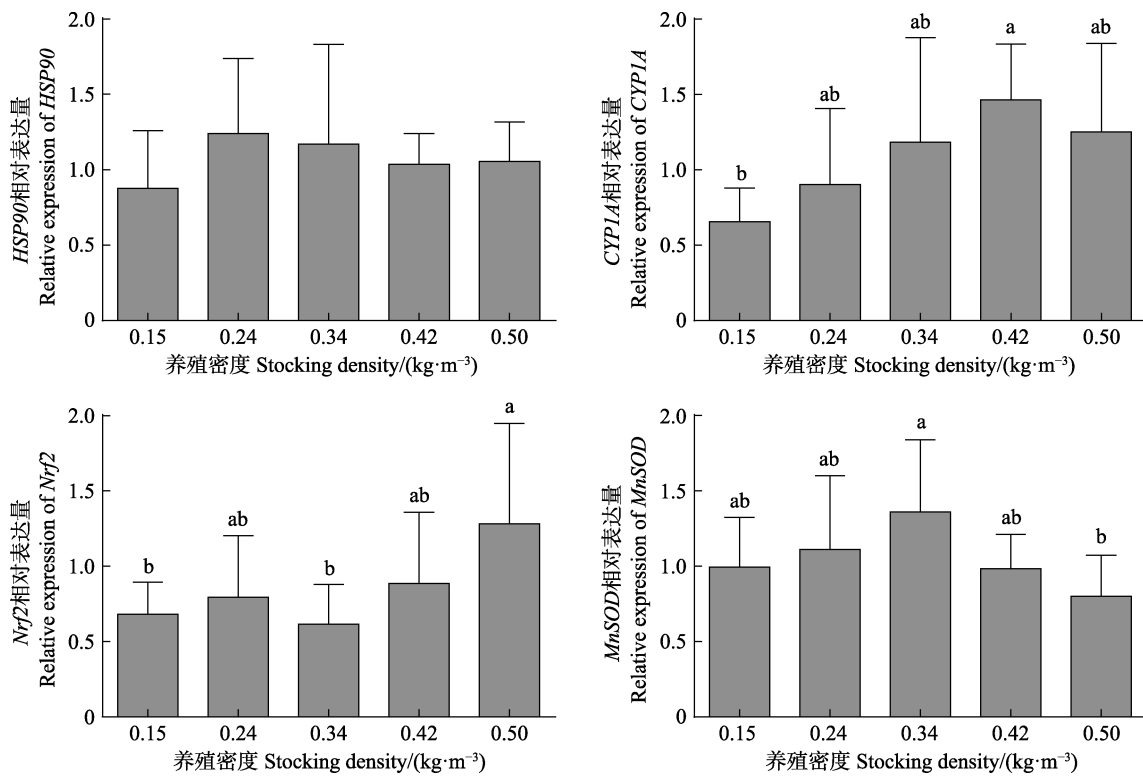


图1 养殖密度对厚颌鲂幼鱼肠道氧化应激相关基因表达的影响

Fig.1 Effects of stocking density on intestinal oxidative stress related genes expressions of juvenile *M. pellegrini*

不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)

Different small letter mean significant differences ($P < 0.05$)

养殖密度较高时会增加鱼体间摄食时的竞争及游动速度,导致能量消耗增加或者影响部分鱼体的摄食过程,最终影响鱼体生长(Calabrese *et al.*, 2017)。本研究结果也显示,当养殖密度过高时(0.50 kg/m^3)厚颌鲂幼鱼饲料系数显著升高。在杂交鳢(*Channa maculata* × *C. argus*) (吴晓清等, 2017)、施氏鲟(Li *et al.*, 2012)等鱼类的研究中也呈现出类似实验结果。同时,还发现随着养殖密度升高,摄食率和蛋白质效率降低,表明过高的养殖密度降低了鱼体对饲料的利用效率,继而影响其生长。但在罗非鱼(左腾等, 2019)、团头鲂(Qi *et al.*, 2016)等鱼类中的研究显示,养殖密度对鱼体饲料系数无显著影响。本实验结束时,所有实验组鱼体成活率均较高,未受到高密度的影响。Iguchi 等(2003)认为,在适宜养殖密度范围内,鱼体成活率受到养殖密度的影响较小,但超过一定阈值后,成活率也会随着密度的升高而降低,这也是大多数实验中鱼体成活率并未受到养殖密度显著影响的主要原因。而 Aksungur 等(2007)研究显示,养殖密度过高时底栖鱼类大菱鲂成活率显著降低。因此,养殖密度对鱼类成活率的影响也与其生活习性密切相关。

鱼类在养殖过程中不断摄取营养物质,通过消化、吸收和转化等过程,将一部分营养物质用于能量

代谢而维持生命活动,其他部分则以蛋白质、脂肪等形式储存,用于生长与繁殖。鱼体蛋白质和脂肪水平能够直接反映鱼类营养价值。而除饲料组成之外,养殖环境和养殖方式等均会对鱼体成分造成显著影响(Toko *et al.*, 2007)。本研究结果显示,最高密度养殖条件下鱼体水分含量、粗蛋白和粗脂肪含量相较于最低密度组显著降低,在斑点叉尾鲟研究中也发现类似结果(Omar, 1996)。Ren 等(2017)研究发现,高密度养殖会引起脂蛋白脂肪酶和脂肪酶 mRNA 表达量降低,过氧化物酶体增殖物激活受体 α mRNA 表达量升高,从而导致高密度组肌肉脂肪含量较低。由此可见,在高密度养殖条件下鱼体脂肪代谢受到影响。针对杂交鲟幼鱼的研究也显示,鱼体粗蛋白、粗脂肪含量随养殖密度增大而降低,养殖 60 d 时,高密度组鱼体粗蛋白含量显著较低,而粗脂肪含量无显著差异(步艳等, 2014)。亓成龙等(2016)研究显示,团头鲂幼鱼鱼体粗脂肪含量则随着养殖密度升高而显著降低,而粗蛋白含量在不同的养殖密度组之前不存在显著性的差异。但在施氏鲟(任源远等, 2014)和瓦氏黄颡鱼(姚清华等, 2018)的研究中,高密度条件下鱼体肌肉粗脂肪含量显著低于低密度组。

鱼类进行正常生命活动时,细胞代谢不断产生氧

自由基。但当机体受到外界环境刺激时,体内产生过多自由基如不能及时清除,则会对细胞分子甚至机体产生危害。大量研究表明,不适宜的养殖密度会导致鱼体产生应激反应,从而产生过量氧自由基(ROS)。SOD 和 CAT 是动物体酶类抗氧化系统的重要组成部分,能够清除体内多余自由基,保护自身免受氧化损伤(Barton, 2002)。本研究结果显示,厚颌鲂幼鱼肠道 SOD 活性和 CAT 活性随养殖密度的增大呈显著下降趋势。同样,在斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*) (郑乐云等, 2013)和大菱鲆(Liu *et al.*, 2016)研究中也发现,血清 SOD 活性和肝脏 SOD、CAT 活性随着养殖密度升高而显著下降。此外,养殖密度过高时,厚颌鲂幼鱼肠道脂质过氧化终产物 MDA 含量显著增加,表明厚颌鲂幼鱼与其他大多数鱼类一样,养殖密度过高时,氧化应激水平会增加。而在鲫鱼(*Carassius cuvieri*)中的研究同样发现,高密度情况下不仅血清 MDA 含量显著升高,碱性磷酸酶和溶菌酶等免疫指标也显著降低(吴宗凡等, 2014)。然而,在石首鱼中研究发现,低密度实验条件下鱼体更易处于应激状态,与高密度组相比具有更高的血清皮质醇和葡萄糖水平(Pirozzi *et al.*, 2009)。由此可见,不同鱼类对养殖密度的耐受存在较大差异,且由应激引起的生理变化也各不相同。

细胞色素 P450 (CYP450)是生物体内含有多种超家族 CYP450 血红蛋白或相同结构域的酶系,作为生物标志物已广泛应用于鱼类环境毒理学研究,其基因或蛋白水平变化能够反映鱼体生理压力和免疫反应(李春杰等, 2014)。当机体受到应激原刺激时,细胞受到损害从而导致变性蛋白数量增加、肽链空间结构改变、蛋白功能丧失。而热休克蛋白(Heat shock proteins, HSPs)是生物体在外界环境应激刺激下诱导生成的一组蛋白质,其中, *HSP90* 可以促进肽链重新折叠,修复变性蛋白,提高细胞对逆境的耐受性(默立宾等, 2018)。本研究表明,在最高养殖密度(0.42 kg/m³)条件下厚颌鲂幼鱼肠道 *CYP1A* 基因表达水平显著高于最低密度组(0.15 kg/m³)。Liu 等(2016)在大菱鲆中的研究显示,较长养殖周期时高密度才会对鱼体产生氧化应激,肝脏 *CYP1A* 和 *HSP70* 基因表达水平显著上调,而 *HSP90* 基因表达不受影响。本研究与塞内加尔鳎鱼等鱼类中的研究一致,发现养殖密度对 *HSP90* 基因表达影响不显著。由此可见,位于内质网和线粒体的 *CYP1A* 更易受到密度胁迫的影响,而 *HSP* 对密度胁迫的响应则与鱼体种类、基因家族类型密切相关,且敏感性可能低于热应激等胁迫因子。

Nrf2 是一种重要的氧化应激敏感性转录因子。动物体在正常生理状态下, *Nrf2* 通过泛素化标记途径降解,当受到氧化应激后, *Nrf2* 游离出来并与抗氧化反应元件结合,促进抗氧化基因的表达,从转录水平调控体内的氧化应激反应。本研究结果显示,最高养殖密度(0.50 kg/m³)条件下,厚颌鲂幼鱼肠道 *Nrf2* 基因表达水平显著高于最低(0.15 kg/m³)和适中(0.34 kg/m³)养殖密度组,表明高密度环境让鱼体处于应激状态从而激活了 *Nrf2* 信号分子。而 Sahin 等(2014)在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)中的研究也发现,高密度养殖条件下 *Nrf2* 被激活由细胞质易位至细胞核从而导致其蛋白表达水平降低,而抗氧化剂番茄红素使高密度养殖条件下鱼体 *Nrf2* 蛋白表达处于较高水平。

锰超氧化物歧化酶(*MnSOD*)是一种含金属辅基的抗氧化酶,能将氧自由基快速歧化为分子氧(O₂)和过氧化氢(H₂O₂)。虽未有养殖密度对 *MnSOD* 基因表达影响的相关报道,但发现其他环境胁迫因子如 pH、温度、重金属和氨氮等会调控其 mRNA 表达水平,从而参与机体氧化应激反应。本研究发现,最高养殖密度(0.50 kg/m³)处理组厚颌鲂幼鱼 *MnSOD* 基因表达水平显著低于适中密度处理组(0.34 kg/m³),表明长期高密度养殖条件下鱼体内氧化应激平衡状态受到影响,从而抑制了抗氧化应激相关基因 *MnSOD* 的有效表达,导致鱼体长时间处于应激状态,生长也受到显著影响。同样, Hoseini 等(2020)在虹鳟中的研究中也发现,养殖密度过高时会引起鱼体肠道的氧化应激反应。Refaey 等(2018)在斑点叉尾鲷的研究中还发现,养殖密度过高时会损伤鱼体肠道结构,如肠道肌层变厚、杯状细胞数量变少、体积变小以及肠道绒毛变短等; Wang 等(2020)在大口黑鲈研究中同样发现,高密度组鱼体肠道杯状细胞数量变少、体积变小,肠道肌层变厚但肠道绒毛无显著变化。而 Sundh 等(2019)研究显示,高密度处理组大西洋鲑肠道屏障功能受到显著影响。由此可见,在高密度养殖条件下肠道结构和功能均受到显著影响,而未来对于养殖密度的研究也应更加关注鱼体的肠道发育状况和健康状态。

4 结论

本研究表明,厚颌鲂幼鱼在体重为 0.45~1.36 g 阶段时,0.34 kg/m³ 的养殖密度能让其获得最大生长。当养殖密度达到 0.5 kg/m³ 时,鱼体不仅饲料利用率下降,生长受到抑制,而且受到氧化应激,表现在肠道氧化应激相关酶活性及基因表达受到显著影响。因此,适宜的养殖密度对于提高厚颌鲂幼鱼苗种培育效

率, 保证其健康生长至关重要。

参 考 文 献

- AKSUNGUR N, AKSUNGUR M, AKBULUT B, *et al.* Effects of stocking density on growth performance, survival and food conversion ratio of turbot (*Psetta maxima*) in the net cages on the southeastern coast of the Black Sea. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2007, 7(2): 147–152
- ANDRADE T F, AFONSO A, PEREZJIMENEZ A, *et al.* Evaluation of different stocking densities in a Senegalese sole (*Solea senegalensis*) farm: Implications for growth, humoral immune parameters and oxidative status. *Aquaculture*, 2015, 438(1): 6–11
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Official methods of analysis association of official analytical chemists. Arlington, VA, USA, 2005
- BARTON B A. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology*, 2002, 42(3): 517–525
- BU Y, LI J F, WEN S H, *et al.* Effect of stocking density on body composition and blood biochemistry of hybrid sturgeon. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2014(3): 69–74 [步艳, 李吉方, 温海深, 等. 养殖密度对大杂交鲟幼鱼体组份和血液生化指标的影响. *海洋湖沼通报*, 2014(3): 69–74]
- CALABRESE S, NILSEN T O, KOLAREVIC J. Stocking density limits for post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) with emphasis on production performance and welfare. *Aquaculture*, 2017, 468(1): 363–370
- COSTAS B, ARAGAO C, DIAS J, *et al.* Interactive effects of a high-quality protein diet and high stocking density on the stress response and some innate immune parameters of Senegalese sole *Solea senegalensis*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2013, 39(5): 1141–1151
- HOSEINI S M, YOUSEFI M, MIRGHAED A T, *et al.* Effects of rearing density and dietary tryptophan supplementation on intestinal immune and antioxidant responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 2020, 528: 735537
- IGUCHI K, OGAWA K, NAGAE M, *et al.* The influence of rearing density on stress response and disease susceptibility of ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Aquaculture*, 2003, 220(1): 515–523
- LI C J, ZHAO J, ZHANG S Y, *et al.* Generation of cytochrome P-450 CYP3A65 labeled fluorescence transgenic zebrafish and its biological response to environmental pollutants. *Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology*, 2014, 28(6): 870–877 [李春杰, 赵建, 张世勇, 等. 细胞色素 P-450 CYP3A65 斑马鱼模型建立及对环境污染物的生物响应. *中国药理学与毒理学杂志*, 2014, 28(6): 870–877]
- LI D P, LIU Z D, XIE C X, *et al.* Effect of stocking density on growth and serum concentrations of thyroid hormones and cortisol in Amur sturgeon, *Acipenser schrenckii*. *Fish Physiology Biochemistry*, 2012, 38: 511–520
- LI W J, WANG J W, XIE C X, *et al.* Age structure and growth characteristics of *Megalobrama pellegrini*—an endemic fish living only in upper reaches of Yangtze River. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2007, 14(2): 215–222 [李文静, 王剑伟, 谢从新, 等. 厚颌鲂的年龄结构及生长特性. *中国水产科学*, 2007, 14(2): 215–222]
- LIMON-PACHECO J H, GONSEBATT M E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2009, 674(1): 137–147
- LIU B L, JIA R, HAN C, *et al.* Effects of stocking density on antioxidant status, metabolism and immune response in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology and Pharmacology*, 2016, 190: 1–8
- LIU J. A quantitative analysis on threat and priority of conservation order of the endemic fishes in upper reaches of the Yangtze River. *China Environmental Science*, 2004, 24(4): 395–399 [刘军. 长江上游特有鱼类受威胁及优先保护顺序的定量分析. *中国环境科学*, 2004, 24(4): 395–399]
- LIU Q, WEN H S, LI J F, *et al.* Effects of different stocking density on the levels of thyroid hormone and plasma lipids in *Oncorhynchus mykiss*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, 38(6): 1076–1083 [刘群, 温海深, 李吉方, 等. 网箱养殖密度对虹鳟甲状腺激素及血脂指标的影响. *水生生物学报*, 2014, 38(6): 1076–1083]
- MILLANCUBILLO A F, MARTOSSITCHA J A, RUIZJARABO I, *et al.* Low stocking density negatively affects growth, metabolism and stress pathways in juvenile specimens of meagre (*Argyrosomus regius*, Asso 1801). *Aquaculture*, 2016, 451: 87–92
- MO L B, LI C H, CHEN J. Molecular cloning, sequence characterization and expression analysis of HSP90 β from ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Journal of Biology*, 2018, 35(1): 5–10 [默立宾, 李长红, 陈炯. 香鱼 HSP90 β 的克隆、序列特征及表达分析. *生物学杂志*, 2018, 35(1): 5–10]
- NI J H, ZHU X J, JI Y P, *et al.* Effects of breeding density on the growth, metabolic enzyme activity and related gene expression level of juvenile *Pampus argenteus*. *Journal of Tropical Oceanography*, 2020, 39(2): 54–64 [倪嘉豪, 朱晓静, 季益平, 等. 养殖密度对银鲟幼鱼生长、代谢酶活力及其相关基因表达的影响. *热带海洋学报*, 2020, 39(2): 54–64]
- NI J J, WANG Y Y, XU G C, *et al.* Effects of stocking density on growth, physiological indexes and gene expression of *GH* and *IGF-I* of largemouth bass *Micropterus salmoides* in pond raceway culture systems. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2020, 35(6): 805–813 [倪金金, 王裕玉, 徐钢春, 等. 养殖密度对池塘循环水养殖大口黑鲈生长、生理指标和 *GH*、*IGF-I* 基因表达的影响. *大连海洋大学学报*, 2020, 35(6): 805–813]
- OMAR E A. Optimum dietary protein level and stocking density for catfish (*Clarias lazera*) fingerlings in concrete ponds. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 1996, 76 (1/2/3/4/5): 122–131
- PIROZZI I, BOOTH M A, PANKHURST P M. The effect of stocking density and repeated handling on the growth of juvenile mulloway, *Argyrosomus japonicus* (Temminck & Schlegel 1843). *Aquaculture International*, 2009, 17: 199–205

- QI C L, XIE C X, TANG R, *et al.* Effect of stocking density on growth, physiological responses, and body composition of juvenile blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala*. *Journal of World Aquaculture Society*, 2016, 47(3): 358–368
- QI C L. Effect of stocking density and nitrite on physiological functions and muscle quality of blunt snout bream *Megalobrama amblycephala* juveniles. Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2016 [亓成龙. 养殖密度和亚硝酸盐胁迫对团头鲂幼鱼生理机能和肌肉品质的影响. 华中农业大学硕士研究生学位论文, 2016]
- QIAO W, SONG X F, GAO C R, *et al.* Effects of stocking density on the growth and physiology of adult turbot and changes in water quality. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(5): 76–82 [乔玮, 宋协法, 高淳仁, 等. 养殖密度对循环水系统中大菱鲂生长的影响. *渔业科学进展*, 2014, 35(5): 76–82]
- REFAEY M M, LI D P, TIAN X, *et al.* High stocking density alters growth performance, blood biochemistry, intestinal histology, and muscle quality of channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture*, 2018, 492: 73–81
- REN Y Y, WEN H S, LI J F, *et al.* Effects and physiological mechanism of stocking density on growth and feeding in juvenile Amur sturgeon *Acipenser schrenckii* in a pond. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2014, 29(1): 45–50 [任源远, 温海深, 李吉方, 等. 池塘放养密度对施氏鲟幼鱼生长、摄食和肌肉组分的影响. *大连海洋大学学报*, 2014, 29(1): 45–50]
- REN Y Y, WEN S H, LI Y, *et al.* Effects of stocking density on lipid deposition and expression of lipid-related genes in Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 2017, 43(6): 1707–1720
- SAHIN K, YAZLAK H, ORHAN C, *et al.* The effect of lycopene on antioxidant status in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reared under high stocking density. *Aquaculture*, 2014, 418–419: 132–138
- SUNDH H, FINNE-FRIDELELL F, ELLIS T, *et al.* Reduced water quality associated with higher stocking density disturbs the intestinal barrier functions of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 2019, 512: 734356
- TOKO I, FIOGBE E D, KOUKPODE B, *et al.* Rearing of African catfish (*Clarias gariepinus*) and vundu catfish (*Heterobranchus longifilis*) in traditional fish ponds (whedos): Effect of stocking density on growth, production and body composition. *Aquaculture*, 2007, 262(1): 65–72
- WANG Y, NI J, NIE Z, *et al.* Effects of stocking density on growth, serum parameters, antioxidant status, liver and intestine histology and gene expression of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) farmed in the in-pond raceway system. *Aquaculture Research*, 2020, 51(12): 5228–5240
- WU X Q, MA H J, GAO S N, *et al.* Physiological responses of hybrid snakehead (*Channa maculata* × *C. argus*) to different stocking densities. *Journal of Fishery Sciences*, 2017, 36(5): 557–562 [吴晓清, 马卉佳, 高胜男, 等. 养殖密度对杂交鳢生长和生理指标的影响. *水产科学*, 2017, 36(5): 557–562]
- WU Z F, SHI X, CHENG G F, *et al.* Effects of stocking density on growth, physiology and immune parameters of *Carassius cuvieri* reared in greenhouse recirculating aquaculture system with constructed wetlands as filters. *South China Fisheries Science*, 2014, 10(5): 39–44 [吴宗凡, 时旭, 程果锋, 等. 养殖密度对温室湿地循环水系统中鲫生长、生理及免疫指标的影响. *南方水产科学*, 2014, 10(5): 39–44]
- XIAO W, LI D Y, ZOU Z Y, *et al.* Effects of different culture densities on growth, metabolism and immune function of tilapia under mixed culture of fish and shrimp in Hainan Province. *Freshwater Fisheries*, 2019, 49(2): 101–106 [肖炜, 李大宇, 邹芝英, 等. 海南地区鱼虾混养模式下密度对罗非鱼的生长、代谢和免疫的影响. *淡水渔业*, 2019, 49(2): 101–106]
- YAO Q H, YAN S A, GUO Q X, *et al.* Effects of stocking density on growth performance and parameters of *Pelteobagrus vachelli* juveniles. *Fujian Agricultural Journal*, 2018, 33(7): 670–675 [姚清华, 颜孙安, 郭清雄, 等. 养殖密度对瓦氏黄颡鱼幼鱼生长品质和生化指标的影响. *福建农业学报*, 2018, 33(7): 670–675]
- ZHANG L, QU K M, ZHANG P, *et al.* Effects of the stocking density on stress response and antioxidant status of *Takifugu rubripes* in recirculating aquaculture systems. *Fishery Modernization*, 2019, 46(4): 14–23 [张龙, 曲克明, 张鹏, 等. 在循环水养殖系统中养殖密度对红鳍东方鲀应激反应和抗氧化状态的影响. *渔业现代化*, 2019, 46(4): 14–23]
- ZHANG X, LIANG M Q, WEI Y L, *et al.* Effects of dietary protein content and stocking density on growth performance, nitrogen excretion, and relevant biochemical parameters of juvenile *Takifugu rubripes*. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(1): 74–83 [张晓, 梁萌青, 卫育良, 等. 饲料中蛋白质含量及养殖密度对红鳍东方鲀幼鱼生长性能、氮排泄及相关生化指标的影响. *渔业科学进展*, 2021, 42(1): 74–83]
- ZHENG L Y, YANG Q H, HUANG Z C, *et al.* Effect of the breeding density and ammonia-nitrogen on growth and immunity of *Epinephelus coioides* in recirculating system. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2013, 22(5): 706–712 [郑乐云, 杨求华, 黄种持, 等. 循环水养殖密度和氨氮对斜带石斑鱼生长和免疫力的影响. *上海海洋大学学报*, 2013, 22(5): 706–712]
- ZUO T, HUANG K, WANG T, *et al.* Effects of stocking density on growth and immune function of juvenile GIFT tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fisheries Science*, 2019, 38(5): 581–588 [左腾, 黄凯, 汪婷, 等. 养殖密度对吉富罗非鱼幼鱼生长、免疫功能的影响. *水产科学*, 2019, 38(5): 581–588]

Effects of Stocking Density on Growth, Feed Utilization and Intestinal Oxidative Stress Resistance in Juvenile *Megalobrama pellegrini* (Tchang, 1930)

WANG Yao, CHEN Chenguang, ZHANG Jieruo, GAO Yujie^①

(Ocean College of Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract This study aimed to determine the optimal stocking density for juvenile *Megalobrama pellegrini*. Meanwhile, enzymology and molecular biology analyses were performed to analyze the effects of stocking density on the intestinal antioxidant enzyme activities and the expression of stress-related genes in this fish species. 5 density treatments groups, including 0.15 kg/m³ (50 tails/barrel), 0.24 kg/m³ (80 tails/barrel), 0.34 kg/m³ (110 tails/barrel), 0.42 kg/m³ (140 tails) /Barrel, 0.50 kg/m³ (170 tails/barrel) were set up in triplicate. The experimental period was 42 days. The results showed that fish growth performance (weight gain rate and specific growth rate) increased as the stocking density increased from 0.15 kg/m³ to 0.34 kg/m³, but no significant differences were found among the groups ($P>0.05$). When stocking density continued to increase, fish growth performance decreased, and significantly lower growth was found in fish reared at a stocking density of 0.50 kg/m³ compared with the 0.34 kg/m³ group ($P<0.05$). Meanwhile, the highest density group (0.50 kg/m³) had a significantly higher feed conversion ratio compared with the low and medium stocking density groups (0.15 kg/m³, 0.24 kg/m³, 0.34 kg/m³) ($P<0.05$), which indicated that the higher stocking density had side effects on fish growth and feed utilization. The results also showed that increasing the stocking density did not significantly affect the survival rate of *M. Pellegrini* ($P>0.05$), and the survival rate of each group was very high (>97%). The crude protein and crude fat content of the whole-body in the fish of the 0.34 kg/m³ group were significantly higher than those in other experimental groups ($P<0.05$). The intestinal antioxidant enzymes and other related indexes of fish were significantly affected by stocking density. Specifically, the 0.24 kg/m³ and 0.34 kg/m³ groups had significantly higher total antioxidant capacity than the lowest-density group (0.15 kg/m³) and the higher-density groups (0.42 kg/m³, 0.50 kg/m³) ($P<0.05$); the activities of intestinal superoxide dismutase and catalase were lowest at 0.50 kg/m³, while content of malondialdehyde was the highest ($P<0.05$); the highest value of glutathione content appeared in the 0.34 kg/m³ group and was significantly higher than that of other experimental groups ($P<0.05$). The lowest density experimental group, 0.15 kg/m³, had the lowest intestinal *CYP1A* gene expression, but a significant difference was only found between the 0.42 kg/m³ experimental group ($P<0.05$). Fish in the 0.50 kg/m³ group had significantly higher relative expression levels of the *Nrf2* gene and significantly lower relative expression levels of *MnSOD* compared with the 0.34 kg/m³ density treatment group ($P<0.05$), which indicated that the intestinal oxidative stress response was induced when the stocking density was too high. The results of this study indicated that *M. Pellegrini* at the weight of 0.45~1.36 g could be cultured at a density of 0.34 kg/m³, which will provide a theoretical basis for improving breeding efficiency and promoting the restoration of the resources of *M. Pellegrini*.

Key words *Megalobrama pellegrini*; Stocking density; Growth; Feed utilization; Intestinal oxidative stress

① Corresponding author: GAO Yujie, E-mail: yujiegao@hotmail.com