

DOI: 10.12264/JFSC2023-0138

不同投喂频率对脊尾白虾生物钟基因表达、生长及肌肉成分组成的影响

王永帅, 柏杨, 孙凯, 徐永健

宁波大学海洋学院, 浙江 宁波 315832

摘要: 为探究不同投喂频率对脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)生长的影响, 确定脊尾白虾养殖适宜投喂频率, 本研究分析了在不同投喂频率下脊尾白虾眼柄和肝脏中的生物钟基因表达节律变化, 评估了不同投喂频率对脊尾白虾生物钟系统同步性的影响, 并开展了生长及肌肉组成的同步养殖验证。结果表明: 在投喂频率为<3次/d时, 生物钟基因的表达节律并没有随着投喂频率的改变而发生变化, 无论在眼柄或肝脏中均表现出相似的表达周期及表达顶相, 且各自的表达量间也无显著性差异变化。然而, 当投喂频率增加到4次/d时, 肝脏中部分生物钟基因的表达节律发生了显著变化, 表现为表达周期改变、相位明显偏移及表达量变化。其中, 投喂频率为3次/d时, 脊尾白虾眼柄与肝脏中生物钟基因表达节律的同步性最高。生长结果也显示, 脊尾白虾的生长性能随投喂频率升高(从1次/d至3次/d时)而升高, 3次/d时达到最高, 其特定生长率及增重率分别为(6.65±0.98)%/d和(199.46±5.42)%。同时, 随着投喂频率升高, 脊尾白虾肌肉组织中的粗蛋白及粗脂肪含量也呈现上升趋势, 在3次/d时达到最高, 分别为(19.98±0.04)%和(1.88±0.23)%。投喂频率对脊尾白虾肝脏中生物钟基因的表达节律有重要影响, 表明该因素对重置或调控脊尾白虾外周生物钟系统有一定的牵引作用。

关键词: 脊尾白虾; 投喂频率; 生物钟系统; 生长; 肌肉组成

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2023)08-0965-10

合理的投喂策略是降低人工养殖成本的有效方法。投喂频率是投喂策略的重要组成部分, 科学合理的投喂频率可以提高饲料的利用率, 提升养殖对象的生长性能, 最大程度地减少养殖水体的污染情况^[1]。在实际生产中, 为追求养殖对象的快速生长, 过量投喂、投喂频率过高等现象时有发生^[2-3], 而过高的投喂频率意味着能量的大量摄入, 这不仅会引起养殖对象的脂肪沉积, 更会进一步对养殖对象的免疫能力、抗氧化能力造成负面影响。

生物钟是由地球24h自转引起的一种节律性生理现象, 存在于生物的全身并影响与控制日常

行为活动节律^[4]。生物钟系统使生物的遗传、生理和行为活动能够与环境条件保持同步振荡^[5], 赋予了生物个体更好适应不断变化的环境的优势^[6]。自从从果蝇中分离出第一个时钟基因突变体以来, 生物钟的分子机制已被详细研究^[7], 大多数生物的生物钟基因都是同源的, 且无论分子碱基如何, 转录-翻译反馈环在节律产生或维持中都发挥着关键作用^[8]。

分子生物钟能够调节细胞内的代谢过程, 而组织之间生物钟系统的同步运行对于维持代谢稳态至关重要^[9]。国内外研究表明, 生物钟系统间的“错位”源于组织对同步时钟的环境线索(如光暗

收稿日期: 2023-06-12; 修订日期: 2023-07-06.

基金项目: 宁波市自然科学基金项目(2022A610282); 宁波大学‘海洋生物技术与海洋工程’学科群专项研究基金(422004582); 三门县农业农村局重点科技攻关项目(建科三-2023-006号).

作者简介: 王永帅(1996-), 男, 硕士, 研究方向为脊尾白虾养殖技术优化. Email: 1304943446@qq.com

通信作者: 徐永健, 教授, 博导, 研究方向为精准养殖技术研究. Email: xuyongjian@nbu.edu.cn

周期、进食时间及频率等)的不同响应^[10]。“光”作为夹带哺乳类及海洋鱼类等动物中枢生物钟系统的主要环境线索早已被证实^[11-14],而在生物钟研究的历史进程当中,人们逐渐发现许多其他组织(如肝脏等)对于进食/禁食的反应也很敏感,当进食行为节奏被改变时,例如改变进食时间、进食次数或提供更“合口”的食物,强烈的反馈会被发送到外周生物钟导致节律及相位偏移,引起代谢过程的全身失调^[9]。例如,相同能量的食物分别以 1 次和 2 次投喂给小鼠时,小鼠外周生物钟基因的表达相位会发生变化^[15],代谢也产生了明显差异。不仅如此,小鼠外周生物钟系统节律对于不同的投喂时间也会产生显著的差异,相位发生明显偏移^[15]。早在 19 世纪初,Stokkan 等^[16]就已经指出小鼠肝脏中的外周昼夜节律振荡器可能主要通过节律行为(如进食时间及周期)与中枢起搏器(SCN)耦合,而包括其他组织的多重节律耦合形成一个连贯运行的系统。中枢生物钟主要主导与活动相关的节律,例如睡眠/觉醒周期、自主神经系统、核心体温和褪黑激素分泌等,而外周生物钟则主导局部生理过程,包括葡萄糖和脂质稳态、激素分泌、异生素、免疫应答和消化系统等^[17]。由于中枢生物钟通过神经元和体液信号组织局部生物钟,因此生物钟系统间的不同步被认为是导致代谢紊乱等不良疾病发展的重要原因,而生物钟系统同步性越高,生物机体代谢效率越好^[18]。基于此,本研究创新性地通过改变投喂频率“强制”改变脊尾白虾外周生物钟的节律相位,并使其与中枢生物钟保持一致,以期获得最高的生长及代谢收益,减少代谢紊乱等疾病的发生率,对于促进实际养殖生产具有重要意义。

投喂频率作为投喂策略的组成对动物的生物钟系统影响的重要性是不容置疑的,但目前在甲壳动物上的研究还很少。脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)是我国重要的经济虾类之一,已开展了广泛的人工养殖生产。但其养殖技术仍然依赖于长期以来形成的养殖经验,缺乏针对性的养殖技术研究,尤其是相关的投喂策略研究未见有报道。业内已证实时钟同步理论的正确性和可行性。为了探寻脊尾白虾人工养殖的适宜投喂频率,完

善投喂策略,优化养殖技术,本研究设置了 4 个投喂频率处理,通过评估有关生物钟基因在不同投喂频率下的表达节律及生物钟系统间的同步性状况来判断脊尾白虾的最适投喂频率,同时还通过脊尾白虾的生长性能及肌肉组成的同步实验来验证所选择结果的可靠性。

1 材料与方法

1.1 实验用虾来源与暂养

实验用脊尾白虾[体长(3.91±0.28) cm, 体重(0.74±0.09) g]来自于浙江省三门县健东海水养殖专业合作社西边塘 2 号土塘[池塘为长方形,面积约 1.33 hm², 滩沟比 5:2, 环沟水深约 1.5 m, 营拟穴青蟹-脊尾白虾-贝类(缢蛭+泥蚶)混养模式],于实验室条件下暂养 1 周。暂养期间每天饱食投喂 1 次配合饲料(天邦南美白对虾 1 号料),保持全天连续充气和水循环。暂养结束后挑选健康、活力好、规格相近的个体进行实验。

1.2 实验设计和日常管理

实验共设置 4 个处理,分别标记为 A(日投喂 1 次,投喂时间为 19:00)、B(日投喂 2 次,投喂时间为 5:00 和 19:00)、C(日投喂 3 次,投喂时间为 5:00、19:00 和 22:00)及 D(日投喂 4 次,投喂时间为 5:00、14:00、19:00 和 22:00)。每个处理 3 个重复。

挑选健康无病、体型均匀、活力好的脊尾白虾共 600 条随机分配到 12 个方形玻璃水族缸中,分别置于光照培养箱中[培养条件为:温度(25±1) °C,盐度 23±1,光照强度 1000 lux],日换水量约 50%,光暗周期为 8 L:16 d,于 9 时开灯,17 时关灯。每次投喂前先清除缸内的残饵及粪便,2 h 后观察和记录残饵情况。每一周都定期取生物样并分析有关水质指标,保持养殖水质稳定,pH7.0~9.0、溶氧>4 mg/L、亚硝氮<0.15 mg/L 和氨氮<0.5 mg/L。整个实验共持续 30 d,第 29 天停喂 1 d,第 30 天采集组织样品。指定采样的起点时间为 6:00,每隔 4 h 采样 1 次,样本分别标记为 ZT6、ZT10、ZT14、ZT18、ZT22 和 ZT2。每次随机取 6 只虾(每个样品混合 2 只虾×3 个重复样品),用过量麻醉剂杀死,收集眼柄和肝脏组织,

在液氮中储存 5 min, 再转移到 -80°C 冰箱中进行后续分析。

在实验开始时及结束后, 分别随机取 10 尾虾称量体重, 用于计算特定生长率(specific growth rate, SGR)、增重率(weight gain rate, WGR)及存活率(survive rate, SR)等生长性能指标。而后取其背部肌肉组织用于水分、粗蛋白、粗脂肪及灰分含量的测定(GB 5009-2016)。

1.3 RNA 提取及 qPCR

采用 Trizol 法提取脊尾白虾肌肉中的 RNA。具体步骤: 冰冻样品于冰浴下解冻, 加入 RNAiso PLUS 溶液, 离心后将上清液转移到新的离心管中并加入氯仿, 再次离心吸取上层无色溶液, 加入等体积的异丙醇并均匀混合用以沉淀 RNA。将获得的 RNA 白色沉淀用乙醇洗涤两次后混入适量 DEPC 水中, 测量其在 260 nm 和 280 nm 波长下的吸光度值, 并用 1%琼脂糖电泳检查所提取的总 RNA 的纯度和完整性。在满足质量要求后, 按 TRANS 逆转录试剂盒说明, 取适量的总 RNA、gDNA 去除剂、随机引物和无 RNase 水合成 cDNA。将获得的 cDNA 稀释 8 倍以进行定量聚合酶链反应(qPCR)。

表 1 为 qPCR 的引物对序列。按要求设计基因扩增引物, 并进行引物的扩增效率验证。再使用 2 \times SYBR Green qPCR Master Mix 试剂盒在 Eppendorf Mastercycler realplex 上进行实时 qPCR。反应体系为: 2 \times SYBR Green Master Mix 10 μL , 正反引物各 1 μL , cDNA 1.5 μL , 无 RNase 水 6.5 μL 。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算靶基因的相对表达量。

1.4 数据分析

所有处理都采用同一个对照, 以便于开展各

表 1 实时 qPCR 的引物对序列和退火温度(T_m)列表

Tab. 1 Primer pair sequences and its T_m for real-time qPCR in the experiment

基因名称 gene name	引物序列(5'-3') primer sequences (5'-3')	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$ annealing temperature
<i>Clock</i>	F:CTCGGTGACCCACAGTCAAA R:ACCTTGGTTGTGGTGAGACG	58
<i>Cry1</i>	F:GACTTGCTCCTTTACCT R:TGTCAAATCCGAGTTTCT	56
<i>Tim</i>	F:CCTAAAGAGGAGGAGTCAG R:CACATTCAGAGCCAGTCG	58
<i>Per2</i>	F:GCGAAAAGCGAGCAAGAAAT R:TACTACCACGAGCAGACCCA	58
β -actin	F:AACTTTCAACACCCAGCCA R:TCTCCAGAGTCCAGCAGAT	58

基因在各处理间的差异比较。采用 Acro 昼夜节律分析程序分析基因表达的原始数据, 以确定目标基因的表达是否满足余弦函数, 通过余弦波拟合出目标基因峰值表达的时间点(顶相时间)。使用单向方差分析来确定每个基因不同采样时间之间的统计差异, Tukey 检验用于确定样本时间点与不同样本平均值之间差异的显著性。生长性能及肌肉成分组成分析采用 SPSS26.0 软件处理, 并进行单因素方差分析(one-way ANOVA)。比较处理间差异显著性采用 Duncan's 检验方法, 以 $P<0.05$ 为显著水平。实验数据用平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm \text{SD}$)表示。

2 结果与分析

2.1 不同投喂频率对脊尾白虾生长性能的影响

经过了 30 d 的养殖, 不同处理间脊尾白虾的生长性能出现了显著差异(表 2)。各处理间脊尾白虾的养殖成活率相近, 然而, 在不同的投喂频率下, 各处理中脊尾白虾的特定生长率和增重率

表 2 不同投喂频率对脊尾白虾生长的影响

Tab. 2 Effect of different feeding frequencies on the growth of *Exopalaemon carinatus*

处理 treatment	虾体初体重/g initial weight	虾体终体重/g terminal weight	增重率/% WR	特定生长率/(%/d) SGR	成活率/% SR
A (1 次/d)	0.741 \pm 0.072	1.578 \pm 0.061	112.96 \pm 1.46 ^c	3.76 \pm 0.33 ^c	88.13%
B (2 次/d)	0.746 \pm 0.091	1.889 \pm 0.172	153.21 \pm 3.58 ^b	5.11 \pm 0.73 ^b	87.51%
C (3 次/d)	0.743 \pm 0.095	2.225 \pm 0.367	199.46 \pm 5.42 ^a	6.65 \pm 0.98 ^a	87.68%
D (4 次/d)	0.745 \pm 0.117	2.112 \pm 0.131	183.49 \pm 5.33 ^a	6.12 \pm 0.76 ^a	88.11%

注: 每列的不同小写字母表示处理间具有差异显著性($P<0.05$)。

Note: Various letter superscripts denote significant differences among treatments in each column ($P<0.05$).

却有了较大的差异。基本上是随着投喂频率增加, SGR 和 WGR 都显著地提高, 并在 3 次/d 的投喂频率时(C 处理)达到最大, 分别为 $(6.65 \pm 0.98)\%/d$ 和 $(199.46 \pm 5.42)\%$, 明显高于 A 和 B 处理($P < 0.05$), 与 D 处理间差异不显著($P > 0.05$)。

2.2 不同投喂频率对脊尾白虾生物钟基因表达的影响

不同投喂频率下, 脊尾白虾眼柄中 4 个生物钟基因的表达变化如图 1。从图 1 可见, 本实验所分析的 4 个生物钟基因(*Clock*、*Cry1*、*Tim* 及 *Per2*) 在所有 4 个处理脊尾白虾的眼柄中均表现出了明显的昼夜节律性, 并且在一昼夜 24 h 内都完成了一个完整的变化周期。但各基因在不同投喂频率下的表现是有差异的。其中, *Clock* 基因在 A 和 B 处理中, 顶相时间都出现在 ZT17 附近, 不过该基因在这两个处理中的表达量相差很大($P < 0.05$); 在 C 和 D 中, *Clock* 基因的表达量相近, 也与 B 处理中的表达量差异不大, 但顶相出现时间却比 B 要前移, 投喂频率越高前移越多。其他 3 个基因的表达顶相均未随投喂频率的改变而改变($P > 0.05$), 但在各处理中的表达量上却受到一定的影响。

不同投喂频率对脊尾白虾肝脏中的生物钟基因的表达影响如图 2, 在肝脏中 4 个钟基因也同样都呈现出显著的节律变化, 但与眼柄中的表现不一样, 各基因在表达周期、顶相出现时间以及表达量上都有较大的差异, 与投喂频率有一定的关系(图 2)。在表达周期上, 4 个基因在 4 个处理中大多数情况下在 24 h 内都完成了一个完整的周期, 除了 A 处理中的 *Tim* 和 C 处理中的 *Clock*, 两者的周期为 32 h, 以及 D 处理中的 *Tim* 和 *Per2* 的周期仅为 10 h。在表达顶相上, 大多数都出现在 ZT17 附近(或其中一次出现在 ZT17 附近), 除 A 处理中 *Tim* 和 *Cry1* 分别在 ZT1 和 ZT21, 以及 B 处理和 C 处理中 *Clock* 分别在 ZT9 和 ZT1。在表达量上, 各基因在各处理的表达量差异很大, 总体上看, A 处理中各基因的表达量相对最低, C 处理中相对最高。

2.3 不同投喂频率对脊尾白虾生物钟系统的同步性分析

比较脊尾白虾的眼柄和肝脏中 4 个生物钟基

因的表达情况, 从各基因的表达周期、顶相出现时间以及表达量上, 来判断不同投喂频率对脊尾白虾中枢和周边生物钟系统的同步性影响情况, 结果见表 3。从表中可见, A、B、C 3 个处理中各基因在眼柄与肝脏的表达的同步性并没有完全相同, 表达周期上有差异, 或顶相出现时间不同, 或相对表达量上有高低, 总体上看, C 处理中稍好一些, 除 *Clock* 基因不同步外, 其他的钟基因基本上同步。而在 D 处理中, 仅 *Cry1* 基因在两个组织中有较好的同步性。

2.4 不同投喂频率对脊尾白虾肌肉组成的影响

表 4 示不同投喂频率对脊尾白虾肌肉组织中各营养成分含量的影响。随着投喂频率的增加, 各处理脊尾白虾肌肉中的水分和灰分含量有所下降, 而粗蛋白和粗脂肪含量有所上升。经比较分析, A 处理中水分和灰分含量要高于其余 3 个处理($P < 0.05$), 而粗蛋白和粗脂肪含量却低于其余各处理($P < 0.05$); 在 B、C、D 3 处理中, 水分和灰分含量相近($P > 0.05$), 但 B 处理的粗蛋白和粗脂肪要低一点, 与 C、D 间存在显著性差异($P < 0.05$); C 与 D 之间的各项指标都不存在显著性差异($P > 0.05$)。

3 讨论

3.1 投喂频率对脊尾白虾生物钟基因表达的影响

投喂频率对水生动物生长性能的影响已受关注, 杨瑞斌等^[19]研究表明投喂频率直接影响黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)幼鱼的摄食行为节律。而金头鲷(*Sparus aurata*)体内的生物钟基因(*Clock* 及 *Per3*)与投喂频率相关性不强^[20]。Kuroda 等^[15]同样也指出小鼠外周生物钟基因的表达相位受投喂频率的影响, 但当投喂频率间隔保持一致时, 这种影响效应会大大减弱。然而, 涉及投喂对甲壳动物活动节律影响的研究比较少, 且大都集中于南美白对虾(*Litopenaeus vannamei*), 如, Santos 等^[21]研究发现南美白对虾偏好夜间进食, 且这种摄食行为节律与光照密切关联。Paredes 等^[22]在研究南美白对虾高效饲喂模式时, 发现该虾对于傍晚投喂有更好的食物消化与吸收表现, 不同投喂频率严重影响其餐前预测(FAA)行为^[23]。这些工作主要与投喂时间有关, 关于投喂频率对甲壳类

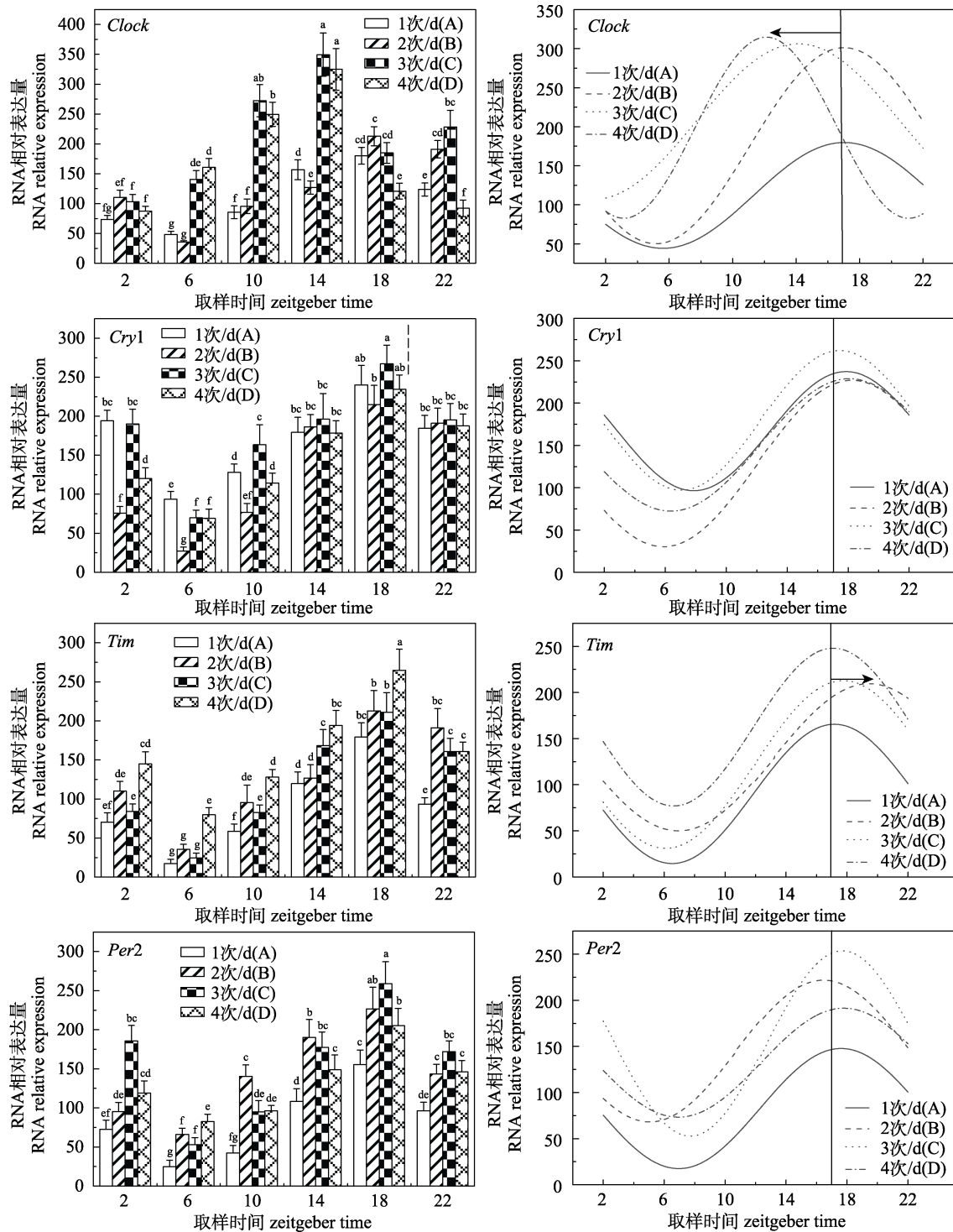


图 1 不同投喂频率对脊尾白虾眼柄中的生物钟基因表达的影响

不同字母表示不同处理基因的相对表达量差异显著($P < 0.05$)。左图为生物钟基因在不同处理下的 mRNA 相对表达量, 右图为根据基因表达量拟合出的余弦曲线, 余弦曲线的存在表明该基因在这一环境条件下存在节律表达。黑色粗线为基因的常规节律顶点, 黑色箭头用来表示基因节律相位的变化。

Fig. 1 Effects of different feeding frequency on the expressions of biological clock genes in the eyestalk of *Exopalaemon carinicauda*. Different letters indicate significant differences in the relative expression of genes in different treatments ($P < 0.05$). The left figure shows the relative mRNA expression of the biological clock gene under different treatments. The right figure shows the cosine curve fitted to the gene expression, and the presence of the cosine curve indicates that there is circadian rhythm in gene expression under the environmental condition. The thick black lines are the regular rhythm vertices of the genes, and the black arrows are used to indicate changes in the phase of the gene rhythm.

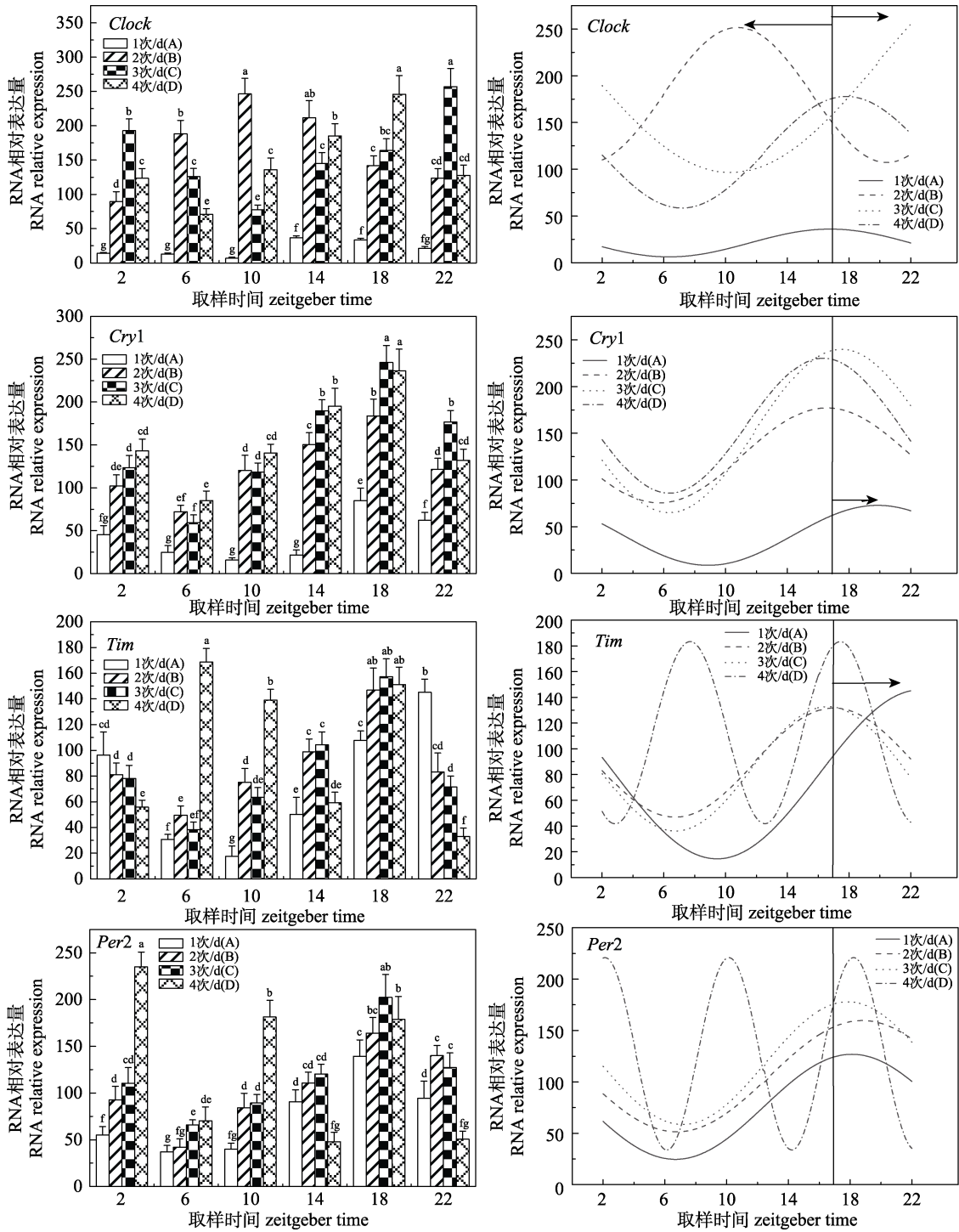


图 2 不同投喂频率对脊尾白虾肝脏中的生物钟基因表达的影响

不同字母表示不同处理基因的相对表达量差异显著($P < 0.05$)。左图为生物钟基因在不同处理下的 mRNA 相对表达量, 右图为根据基因表达量拟合出的余弦曲线, 余弦曲线的存在表明该基因在这一环境条件下存在节律表达。黑色粗线为基因的常规节律顶点, 黑色箭头用来表示基因节律相位的变化。

Fig. 2 Effects of different feeding frequency on the expressions of biological clock genes in the liver of *Exopalaemon carinicauda*. Different letters indicate significant differences in the relative expression of genes in different treatments ($P < 0.05$). The left figure shows the relative mRNA expression of the biological clock gene under different treatments. The right figure shows the cosine curve fitted to the gene expression, and the presence of the cosine curve indicates that there is circadian rhythm in gene expression under the environmental condition. The thick black lines are the regular rhythm vertices of the genes, and the black arrows are used to indicate changes in the phase of the gene rhythm.

表 3 各处理中 4 个钟基因在眼柄和肝脏中的表达同步性分析

Tab. 3 Analysis of the expression synchronicity of 4 clock genes in each treatment during the experiment

处理 treatment	基因 gene	周期(眼柄/肝脏) expression cycle (eye-stalk/liver)	相对表达量(眼柄/肝脏) relative expression (eye-stalk/liver)	顶相时间(眼柄/肝脏) acro phase time (eye-stalk/liver)
A (1 次/d)	<i>Clock</i>	1/1.20	179.69±13.97/35.99±2.65*	ZT17±0.93/ZT17±1.21
	<i>Cry1</i>	1/1.33	236.96±24.86/72.69±14.45*	ZT17±0.85/ZT17±0.96
	<i>Tim</i>	1/0.75	165.52±18.44/145.2±10.25	ZT17±0.82/ZT1±1.10*
	<i>Per2</i>	1/1	147.72±18.52/126.8±17.46	ZT17±0.79/ZT17±1.01
B (2 次/d)	<i>Clock</i>	1/1.33	301.11±8.22/251.24±24.81*	ZT17±0.95/ZT13±1.21*
	<i>Cry1</i>	1/1.08	226.8±24.68/177.13±19.64*	ZT17±0.73/ZT17±0.98
	<i>Tim</i>	1/1	209.4±25.99/131.45±17.13*	ZT17±1.05/ZT17±1.04
	<i>Per2</i>	1/1	221.73±27.98/159.65±16.87 ^b	ZT17±0.71/ZT17±1.12
C (3 次/d)	<i>Clock</i>	1/0.75	306.09±26.21/254.86±16.87	ZT13±1.05/ZT1±1.19*
	<i>Cry1</i>	1/1	262.05±23.99/239.86±19.76	ZT17±0.71/ZT17±0.79
	<i>Tim</i>	1/1	212.81±25.22/132.42±13.92*	ZT17±0.94/ZT17±0.97
	<i>Per2</i>	1/1	253.53±28.15/177.78±24.53*	ZT17±0.85/ZT17±0.94
D (4 次/d)	<i>Clock</i>	1.08/1	306.79±34.94/177.92±27.38*	ZT13±0.85/ZT17±1.29*
	<i>Cry1</i>	1/1	228.72±18.45/230.31±25.06	ZT17±0.89/ZT17±0.97
	<i>Tim</i>	1/2.38	247.96±26.91/183.42±13.65*	ZT17±0.94/ZT9 (ZT17)
	<i>Per2</i>	1/2.38	191.38±22.21/220.86±24.44	ZT17±0.87/ZT9 (ZT17)

注: *表示同一处理中同一基因的表达参数在不同部位存在差异显著性($P<0.05$)。

Note: * letters indicate significant differences in expression parameters of the same gene in the same treatment in different tissues ($P<0.05$).

表 4 不同投喂频率对脊尾白虾肌肉组成的影响

Tab. 4 Effects of different feeding frequency on muscle composition of *Exopalaemon carinicauda*

处理 treatment	水分 moisture	粗蛋白 rude protein	粗脂肪 rude fat	灰分 ash content
A (1 次/d)	77.31±0.72 ^a	18.11±0.02 ^c	1.71±0.05 ^c	2.87±0.08 ^a
B (2 次/d)	76.65±0.77 ^b	19.07±0.08 ^b	1.79±0.13 ^b	2.69±0.07 ^b
C (3 次/d)	75.98±0.96 ^b	19.98±0.04 ^a	1.88±0.23 ^a	2.66±0.09 ^b
D (4 次/d)	75.95±0.59 ^b	19.73±0.08 ^a	1.83±0.09 ^a	2.63±0.12 ^b

注: 每列不同字母表示处理间具有差异显著性($P<0.05$)。

Note: Different letters in the same column denotes significant difference among different treatments ($P<0.05$).

行为影响的研究还未见于报道。脊尾白虾也喜好夜间进食, 夜间运动及摄食比较活跃, 其投喂策略可参考南美白对虾。在实际生产中, 养殖户也是仿照南美白对虾(甚至投喂相同的配合饲料)的操作进行早晚两次投喂, 是否科学还有待于深入研究。本研究仅描述了不同投喂频率对脊尾白虾的眼柄及肝脏中的生物钟基因表达节律的影响, 并对两个组织中的生物钟系统的同步性进行了评估, 用于推测脊尾白虾的合理投喂频率。结果表

明, 投喂频率改变并不会引起脊尾白虾中枢生物钟基因表达的变化; 此外, 投喂频率控制在 3 次/d 以内同样也不会引起外周钟基因表达的大幅变化。表明 1~3 次/d 的投喂频率, 脊尾白虾生物钟系统间的同步性较高, 有利于脊尾白虾的生长。而当投喂频率为 4 次/d 时, 脊尾白虾外周钟基因的表达发生了改变, 表达周期缩短、表达相位提前等表现与中枢生物钟基因的表达存在很明显的差异, 系统间的同步性变弱, 这种现象可能会对脊尾白虾的生长产生负影响。当然, 投喂频率与水温等其他因素也密切相关, 因此脊尾白虾的合适投喂策略还需进一步深入探讨。

3.2 投喂频率对脊尾白虾生长的影响

投喂频率是养殖技术的重要组成, 选择合适的投喂频率是养殖生态和营养生理研究中的重要内容^[24]。适宜的投喂频率能够提高水产动物的生长性能, 减少饲料浪费, 提高饲料转化率, 还能消除水质恶化风险, 降低病害发生概率, 提高养殖存活率及养殖产量, 从而提高养殖效益。不合理投喂将导致水产动物生长性能下降, 个体间生

长差异变大, 饲料浪费, 水质环境恶化, 养殖成本和风险大大提高^[22,25]。本研究得出, 脊尾白虾在3次/d的投喂频率下生长性能最好。张志东等^[26]在研究脊尾白虾时也得出相同的结果, 南美白对虾^[27]和日本沼虾^[28]也适合这一投喂频率, 在3次/d时的增重率最好。但黑虎虾(*Penaeus monodon*)的研究结果有些不同, 其生长性能与投喂频率无关^[29]。鱼类中也有相关的研究, 如, 翻车鱼(*Lepomis cyanellus*)、鲮(*Limanda ferruginea*)等, 前者的最佳投喂频率也是3次/d^[30]; 后者在日投喂2次时的生长性能远高于日4次^[31]。这些都表明过高的投喂频率并不能获得更好的生长效益。当然投喂不足也不能促进生物生长, 每一个生物都有一个最适的限度存在^[32-34]。实际上, 高投喂频率对应高生长性能在很多养殖物种是适用的, 但上述案例都不符合。而造成这种结果的原因目前尚不明确, 可能高投喂频率缩短了生物的进食间隔, 食物通过消化道的速度变快而导致食物转化率降低, 从而造成生长性能下降^[35]; 也有可能与生物钟系统的同步性有关, 因为在一些生物的研究中发现, 当在规定条件下进食生物会表现出与生物钟相关的对特定时间点进食的偏好^[36-37]。毕竟投喂频率这一非生物因素在脊尾白虾中是能夹带外周生物钟系统发生偏移, 从而影响生物钟系统同步性的。

3.3 投喂频率对脊尾白虾肌肉组成的影响

肌肉成分是评估水产品品质的重要标准之一。本研究中, 不同投喂频率对脊尾白虾的肌肉组成有显著的影响, 当投喂频率增加到3次/d时, 脊尾白虾肌肉组织中粗蛋白及粗脂肪含量均有显著提高, 水分和灰分含量下降, 肌肉紧致结实, 口感好。张志东等^[26]在研究不同投喂模式对脊尾白虾体成分影响时也发现相同的结果。在一些鱼类如黄颡鱼^[38]、鲈^[39]等, 投喂频率的改变同样能够显著影响其体成分的含量组成。也有一些不一致的报道, 周歧存等^[40]在研究不同投喂频率对南美白对虾生长及体成分影响时却发现, 随着投喂频率的增加, 南美白对虾肌肉中的水分、脂肪、灰分和蛋白质的含量并无显著变化, 因此提高投喂频率, 并不改变该虾的主要营养组成。投喂频率的改变也不会影响日本沼虾的体成分组成^[12]。

这也可能与试验对象的不同生长发育期有关。而本研究中的脊尾白虾正处于快速生长阶段, 3次/d投喂频率时其生物钟系统的同步性最高, 机体代谢较稳定, 食物的吸收及转化效率高, 有利于肌肉组织中粗蛋白及粗脂肪等物质的逐渐积累。

参考文献:

- [1] Chi X T. Techniques for reducing feed coefficient in *Penaeus vannamei* culture[J]. Qilu Fishery, 2018, 35 (4): 30-30. [迟新涛. 南美白对虾养殖中降低饵料系数的技巧[J]. 齐鲁渔业, 2018, 35(4): 30-30.]
- [2] Liu W, Jiang M, Wu F, et al. Effects of feed energy density and feeding level on growth and health of gift tilapia[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2022, 46 (1): 59-68. [刘伟, 蒋明, 吴凡, 等. 饲料能量密度和投喂水平对吉富罗非鱼生长和健康的影响[J]. 水生生物学报, 2022, 46(1): 59-68.]
- [3] Naiel M A E, Negm S S, Ghazanfar S, et al. The risk assessment of high - fat diet in farmed fish and its mitigation approaches: A review[J]. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 2022, 6(3): 1439-2396.
- [4] Oike H, Oishi K, Kobori M. Nutrients, clock genes, and chrononutrition[J]. Current Nutrition Reports, 2014, 3(8): 204-212.
- [5] Young M W, Kay S A. Time zones: a comparative genetics of circadian clocks[J]. Nature Reviews Genetics, 2001, 2(9): 702-715.
- [6] López-Olmeda J F, Sánchez-Vázquez F J. Thermal biology of zebrafish (*Danio rerio*)[J]. Journal of Thermal Biology, 2011, 36(2): 91-104.
- [7] Konopka R J, Benzer S. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1971, 68(9): 2112-2116.
- [8] Rosbash M. The implications of multiple circadian clock origins[J]. PLoS Biology, 2009, 7(3): e1000062.
- [9] Tahara Y, Shibata S. Chronobiology and nutrition[J]. Neuroscience, 2013, 253: 78-88.
- [10] Pickel L, Sung H K. Feeding rhythms and the circadian regulation of metabolism[J]. Frontiers in Nutrition, 2020, 7(1): 39-40.
- [11] Roenneberg T, Merrow M. The circadian clock and human health[J]. Current Biology, 2016, 26(10): 432-443.
- [12] Reppert S M, Weaver D R. Coordination of circadian timing in mammals[J]. Nature, 2002, 418(6901): 935-941.
- [13] Welsh D K, Takahashi J S, Kay S A. Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties[J]. Annual Review of Physiology, 2010, 72(8): 551-577.
- [14] Delaunay F, Thisse C, Marchand O, et al. An inherited

- functional circadian clock in zebrafish embryos[J]. *Science*, 2000, 289(5477): 297-300.
- [15] Kuroda H, Tahara Y, Saito K, et al. Meal frequency patterns determine the phase of mouse peripheral circadian clocks[J]. *Scientific Reports*, 2012, 2(1): 711.
- [16] Stokkan K A, Yamazaki S, Tei H, et al. Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding[J]. *Science*, 2001, 291(5503): 490-493.
- [17] Richards J, Gumz M L. Advances in understanding the peripheral circadian clocks[J]. *The FASEB Journal*, 2012, 26(9): 3602-3613.
- [18] Albrecht U. Timing to perfection: the biology of central and peripheral circadian clocks[J]. *Neuron*, 2012, 74(2): 246-260.
- [19] Yang R B, Xie C X, Wei K J, et al. The daily feeding rhythms of juvenile yellow catfish, *Pelteobagrus fulvidraco* at different feeding frequencies[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2006, 25(3): 274-276. [杨瑞斌, 谢从新, 魏开建, 等. 不同投喂频率下黄颡鱼幼鱼的摄食节律研究[J]. *华中农业大学学报*, 2006, 25(3): 274-276.]
- [20] Gilannejad N, Moyano F J, Martínez-Rodríguez G, et al. The digestive function of gilthead seabream juveniles in relation to feeding frequency[J]. *Aquaculture*, 2021, 531: 735867.
- [21] Santos A D A, López-Olmeda J F, Sánchez-Vázquez F J, et al. Synchronization to light and mealtime of the circadian rhythms of self-feeding behavior and locomotor activity of white shrimps (*Litopenaeus vannamei*)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2016, 199: 54-61.
- [22] Paredes J F, Vera L M, Martínez-Lopez F J, et al. Circadian rhythms of gene expression of lipid metabolism in gilthead sea bream liver: Synchronisation to light and feeding time[J]. *Chronobiology International*, 2014, 31(5): 613-626.
- [23] Peixoto S, Silva E, Costa C B, et al. Effect of feeding frequency on growth and enzymatic activity of (*Litopenaeus vannamei*) during nursery phase in biofloc system[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2018, 24(1): 579-585.
- [24] Tacon A G J, Jory D, Nunes A. Shrimp feed management: issues and perspectives[J]. *On-farm Feeding and Feed Management in Aquaculture*, 2013, 583: 481-488.
- [25] Xu W, Xu Y, Su H, et al. Effects of feeding frequency on growth, feed utilization, digestive enzyme activity and body composition of (*Litopenaeus vannamei*) in biofloc-based zero-exchange intensive systems[J]. *Aquaculture*, 2020, 522: 735079.
- [26] Zhang Z D, Chen A H, Wu Y P, et al. Effects of different feeding modes on the growth, digestive enzyme activity, body composition, and aquaculture water quality of *Exopalaemon carinicauda*[J]. *Chinese Fisheries Science*, 2020, 9:1075-1084. [张志东, 陈爱华, 吴杨平, 等. 不同饲料投喂模式对脊尾白虾生长, 消化酶, 体成分及养殖水环境的影响[J]. *中国水产科学*, 2020, 9: 1075-1084.]
- [27] De Lima P P, Pontes C S, Arruda M F. Activity pattern of the marine shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in laboratory as a function of different feeding frequencies[J]. *Aquaculture Research*, 2009, 41(1): 53-60.
- [28] Song D Y, Zhang Y X, Zhao W H, et al. Preliminary study on the effects of different feeding frequencies on *Macrobrachium nipponense*[J]. *Shanghai Agricultural Science and Technology*, 2009 (5): 78-80. [宋大焯, 张余霞, 赵卫红, 等. 不同投喂频率对日本沼虾影响的初步研究[J]. *上海农业科技*, 2009, (5): 78-80.]
- [29] Smith D M, Burford M A, Tabrett S J, et al. The effect of feeding frequency on water quality and growth of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)[J]. *Aquaculture*, 2002, 207(1-2): 125-136.
- [30] Wang N, Hayward R S, Noltie D B. Effect of feeding frequency on food consumption, growth, size variation, and feeding pattern of age-0 hybrid sunfish[J]. *Aquaculture*, 1998, 165(3-4): 261-267.
- [31] Siraj S S, Kamaruddin Z, Satar M K A, et al. Effects of feeding frequency on growth, food conversion and survival of red tilapia (*Oreochromis mossambicus/O. niloticus*) hybrid fry[C]. *The Second International Symposium on Tilapia in Aquaculture. ICLARM Conference Proceedings*. 1988, 15(6): 383-386.
- [32] Tsevis N, Klaoudatos S, Conides A. Food conversion budget in sea bass, *Dicentrarchus labrax*, fingerlings under two different feeding frequency patterns[J]. *Aquaculture*, 1992, 101(3-4): 293-304.
- [33] Dwyer K S, Brown J A, Parrish C, et al. Feeding frequency affects food consumption, feeding pattern and growth of juvenile yellowtail flounder (*Limanda ferruginea*)[J]. *Aquaculture*, 2002, 213(1-4): 279-292.
- [34] Pontes C S, De Lima P P, Arruda M F. Feeding responses of juvenile shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed at different frequencies under laboratory conditions[J]. *Aquaculture Research*, 2008, 39(13): 1416-1422.
- [35] Liu F G, Liao I C. Effect of feeding regimen on the food consumption, growth, and body composition in hybrid striped bass *Morone saxatilis* × *M. chrysops*[J]. *Fisheries Science*, 1999, 65(4): 513-519.
- [36] Boujard T, Leatherland J F. Circadian rhythms and feeding time in fishes[J]. *Environmental Biology of Fishes*, 1992, 35: 109-131.
- [37] Kadri S, Metcalfe N B, Huntingford F A, et al. Daily feeding rhythms in Atlantic salmon I: feeding and aggression in parr

- under ambient environmental conditions[J]. *Journal of Fish Biology*, 1997, 50(2): 267-272.
- [38] Feng P F, Ma H W, He J Z, et al. Effects of feeding frequency on growth performance, chemical composition, digestive enzyme activity and amino acid composition of juvenile *Pelteobagrus fulvidraco*[J]. *Journal of Animal Nutrition*, 2021, 16 (3): 1004-1224. [冯鹏霏, 马华威, 何金钊, 等. 投喂频率对黄颡鱼幼鱼生长性能, 化学成分, 消化酶活性和氨基酸组成的影响[J]. *动物营养学报*, 2021, 16(3): 1004-1224.]
- [39] Qiu T T, Wang X J, Ma H J, et al. Effects of feeding frequency on the growth, feed utilization, digestive enzyme activity, and biochemical composition of hybrid bream[J]. *Hubei Agricultural Science*, 2019, 58 (8): 105-111. [邱婷婷, 王秀娟, 马恒甲, 等. 投喂频率对杂交鲂生长, 饲料利用, 消化酶活性及鱼体生化组成的影响[J]. *湖北农业科学*, 2019, 58(8): 105-111.]
- [40] Zhou Q C, Zheng S X, Gao L, et al. A preliminary study on the effects of feeding frequency on the growth, feed utilization, and shrimp body composition of *Penaeus vannamei*[J]. *Marine and Limnology Bulletin*, 2003 (2): 64-68. [周歧存, 郑石轩, 高雷, 等. 投喂频率对南美白对虾(*Penaeus vannamei*)生长, 饲料利用及虾体组成影响的初步研究[J]. *海洋湖沼通报*, 2003 (2): 64-68.]

Effects of feeding frequency on clock gene expression, growth, and muscle composition of *Exopalaemon carinicauda*

WANG Yongshuai, BO Yang, SUN Kai, XU Yongjian

School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315832, China

Abstract: Asynchrony among the various biological clock systems is considered one of the primary reasons for the occurrence and development of adverse diseases such as physiological and metabolic disorders. Changes in feeding frequency can affect the expression rhythms of the biological clock system, thereby affecting biological growth and development. To investigate the effect of feeding frequency on the growth of *Exopalaemon carinicauda* and determine the appropriate feeding frequency for its cultivation, this study analyzed the rhythmic changes in biological clock gene expression in the eyestalk and liver of *E. carinicauda* under varying feeding regimens, evaluated the impact of different feeding frequencies on the synchronization of biological clock systems in *E. carinicauda*, and simultaneously verified growth and muscle composition changes through cultivation. The results showed that when the feeding frequency was less than 3 times per day, the expression rhythm of biological clock genes did not change in response to changes in feeding frequency. Similar expression cycles and peak phases were observed in both the eyestalk and liver, with no significant difference in their respective expression levels. However, when the feeding frequency increased to 4 times per day, there were significant changes in the expression rhythm in the liver, which manifested as changes in the expression cycle, phase shifts, and expression levels themselves. Notably, when the feeding frequency is 3 times per day, the synchronization of clock gene expression rhythm between the eyestalk and the liver is at its highest. Furthermore, the results also showed that the growth of *E. carinicauda* increased with feeding frequency from 1 to 3 times/d. Indeed, the specific growth rate (SGR) and weight gain rate (WGR) were $(6.65\pm 0.98)\%/d$ and $(199.46\pm 5.42)\%$, respectively. Concurrently, as the feeding frequency increased, so did the crude protein and crude fat content in the muscle tissue, reaching a maximum in the treatment C with $(19.98\pm 0.04)\%$ and $(1.88\pm 0.23)\%$, respectively. In summary, the feeding frequency has a significant impact on the expression rhythm of circadian clock genes in the liver of *E. carinicauda*, indicating its modulatory effect on resetting or regulating the peripheral circadian clock system.

Key words: *Exopalaemon carinicauda*; feeding frequency; biological clock system; growth; muscle composition

Corresponding author: XU Yongjian. E-mail: xuyongjian@nbu.edu.cn