

DOI: 10.12264/JFSC2020-0138

投喂频率对池塘循环水养殖大口黑鲈消化酶、组织结构及脂代谢酶基因表达的影响

谢苏明¹, 徐钢春^{1,2}, 王裕玉², 聂志娟², 孙毅², 李全杰²

1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业农村部淡水渔业和种质资源利用重点实验室, 江苏 无锡 214081

摘要: 为研究池塘工程化循环水养殖模式下投喂频率(2 次/d、3 次/d、4 次/d)对大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)体成分、肠道消化和肝脏组织结构及脂蛋白酯酶(*LPL*)和肝脂酶(*HL*)基因相对表达丰度的影响, 选用平均体重为(5.0±0.4) g 的大口黑鲈为研究对象, 在池塘工程循环水养殖系统中进行为期 120 d 的养殖实验。结果表明, 投喂频率对鱼体全鱼的粗脂肪和灰分含量影响显著($P<0.05$); 投喂频率 2 次/d 组的灰分含量显著高于其他两组, 而 2 次/d 组体脂肪含量低于投喂 3 次/d、4 次/d 组, 体水分和粗蛋白含量均不受投喂频率的影响($P>0.05$); 投喂频率 2 次/d 组肠道淀粉酶和脂肪酶活性显著高于 4 次/d 投喂组($P<0.05$); 投喂频率对大口黑鲈肠道绒毛高度和宽度影响不显著($P>0.05$), 4 次/d 组肠道绒毛排列整齐度下降且肌层厚度显著低于 2 次/d 和 3 次/d 组($P<0.05$)。肝脏组织学显示, 投喂频率越高肝脏脂肪堆积加重, 相对于 2 次/d 和 3 次/d 组, 4 次/d 组肝细胞偏移、空泡化的现象较明显。在第 60 天和 90 天, 2 次/d 组 *LPL* 基因相对表达量显著高于 4 次/d 组($P<0.05$); 而在第 120 天时, *LPL* 的相对表达量在各组间差异不显著($P>0.05$)。2 次/d 组 *HL* 基因相对表达量显著高于 4 次/d 组($P<0.05$)。综合分析, 在饱饲投喂条件下, 池塘循环水养殖大口黑鲈的适宜投喂频率为 2 次/d。

关键词: 大口黑鲈; 投喂频率; 池塘工程化循环水养殖系统; 肠道消化; 基因表达丰度

中图分类号: S961

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2021)02-0157-10

大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)隶属于辐鳍鱼纲(Actinopterygii)、鲈形目(Perciformes)、太阳鱼科(Centrarchidae)、黑鲈属, 俗称加州鲈, 是原产于北美洲的淡水鱼类^[1], 其具有经济价值高、抗逆性强、易于饲养等特点, 于 1983 年首次引入中国养殖, 现已成为是中国重要的淡水经济养殖鱼类之一^[2]。目前大口黑鲈主要的养殖方式为传统池塘化养殖、池塘循环水养殖和网箱养殖。传统池塘化养殖模式对自然环境和空间的依赖性较强, 且存在较多不可控的因素, 影响净化区域尾水的净化效率与养殖效益, 不利于水

产养殖的可持续性发展^[3]; 而湖泊、水库的网箱养殖方式正逐步被取缔。

池塘工程化循环水养殖系统(in-pond raceway aquaculture systems, IPRS)具有可控性高、节约资源、保护环境等优点, 是目前主要推广的水产健康养殖模式之一^[3-4]。在中国、挪威、日本、法国等国家, 池塘循环水养殖系统已成功用于养殖多种鱼类, 如海鲈(*Perca fluviatilis*)、军曹鱼(*Rachycentron canadum*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、大西洋鲑(*Salmo salar*)等^[5-8]。近年来, 随着池塘工程化循环水养殖模式迅速发展, 在养殖管理中, 投喂频

收稿日期: 2020-05-12; 修订日期: 2020-09-07.

基金项目: 现代农业产业技术特色淡水鱼体系项目(CARS-46); 江苏省农业科技自主创新基金项目(CX(16)1004); 中央级公益性科研院所基本科研业务费资助项目(2018JBFR01).

作者简介: 谢苏明(1992-), 女, 硕士研究生, 主要从事池塘工程化循环水生态养殖研究. E-mail: xiesuming0797@163.com

通信作者: 徐钢春, 博士, 研究员, 研究方向为水产健康养殖技术. E-mail: xugc@ffrc.cn

率是一个非常重要的因素,科学的投喂频率是提高养殖效益的一种途径,然而不合理的投喂频率会对鱼类产生不利影响^[9]。诸多研究结果显示投喂频率与鱼类的成活率、生长、健康以及产量密切相关^[10-11]。不合理的投喂频率会引起水质恶化、个体间差异大,影响摄食率、消化率和代谢吸收,最终导致鱼类生理功能紊乱从而影响鱼类的生长^[12]。因此,在水产养殖中选择适当的投喂频率至关重要。

大口黑鲈为肉食性鱼类,对碳水化合物利用能力较差,以脂肪、蛋白质为主要能量来源,鱼体对脂肪消化和代谢的功能显得尤为重要^[13-14],是研究脂质代谢的理想实验材料。肝脏具有脂类分解、消化、代谢的功能^[15],其分泌的胆汁能促进脂类的吸收。肝脂酶(HL)通过催化作用促使极低密度脂蛋白代谢和高密度脂蛋白发生脂蛋白颗粒和密度的变化,代谢甘油三酯和磷脂为鱼体组织提供能量^[16];脂蛋白酯酶(LPL)经由水解作用,将胆固醇和甘油三酯等脂类催化成酸类与醇类^[17]。关于鱼类 HL、LPL 脂肪代谢相关基因的表达式的研究主要集中在禁食、投喂方式、饥饿胁迫方面^[17-20]。而投喂频率作为养殖管理方式之一,影响鱼类消化吸收能力^[12,21-22]。目前尚未见投喂频率对大口黑鲈肝脏和肠道健康及 HL、LPL 基因表达的影响的报道。鉴于此,通过研究投喂频率对大口黑鲈消化酶活性、肝脏和肠道形态、脂代谢相关基因(HL、LPL)的影响,以探讨不同投喂频率对大口黑鲈消化及脂肪代谢的影响,旨在为大口黑鲈健康养殖提供科学参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用鱼种购于江苏省苏州市金澄福渔业科技有限公司。正式实验前,将规格一致、初始体重为 (5.0 ± 0.4) g、体长为 (5.9 ± 0.5) cm的健康大口黑鲈幼鱼在养殖系统中进行 2 周的驯养,使之逐步适应养殖环境条件。养殖 120 d 后,大口黑鲈生长状况良好,存活率达到 90.07%~92.01%,2 次/d、3 次/d、4 次/d 组鱼平均体重分别为 141.80 g、136.02 g、132.75 g^[23]。

1.2 池塘工程化循环水养殖系统

实验在中国水产科学研究院淡水渔业研究中心扬中基地池塘工程化流水槽循环水养殖系统内进行。该养殖系统为能耗最低的对角循环流水模式,养殖系统流水槽分为气提推水增氧区($5\text{ m}\times 1.2\text{ m}\times 1.2\text{ m}$)、养殖区($22\text{ m}\times 5\text{ m}\times 2.5\text{ m}$)和集污区($5\text{ m}\times 3\text{ m}\times 2.5\text{ m}$)。流水槽前端安装气提推水增氧装置;养殖区底部安装增氧设施。净化区约占池塘总面积的 97%,主要通过物理沉淀法、浮床栽种空心菜、薄荷和鱼腥草以及放养花白鲢和三角帆蚌对养殖尾水进行净化处理。养殖水源为长江水,符合《渔业水质标准》(GB 11607-1989)^[24]。

1.3 实验设计及饲养管理

实验随机分为 3 个投喂频率组(2 次/d、3 次/d 和 4 次/d),每个处理组设 3 个重复,放养密度为 20000 尾/槽。实验期间,投喂大口黑鲈专用膨化颗粒饲料(浙江欣欣天恩水产饲料有限公司,粗蛋白含量 $\geq 47\%$,粗脂肪含量 $\geq 5\%$)。投喂频率与时间分别为 2 次/d 组(6:00, 18:00),3 次/d 组(6:00, 12:00, 18:00)和 4 次/d 组(6:00, 10:00, 14:00, 18:00)。饱食投喂,每次持续投喂约 30 min,投喂 2 h 后开启集排污系统清除残饵和粪便。饲料粒径根据鱼体规格而定。实验期间,24 h 持续气提推水增氧,采用多参数水质实时在线检测分析仪(Tethys, 法国)监测水质状况,溶氧 ≥ 4.0 mg/L,水温为 20~32 °C,氨氮 <0.03 mg/L,亚硝酸盐 <0.02 mg/L, pH 为 7.5~8.6。实验周期为 120 d。

1.4 样品采集

分别在养殖的第 30 天、60 天、90 天和第 120 天采集样品,采样前禁食 24 h。采样时,每个重复随机取 20 尾鱼,用 MS-222 快速麻醉,冰上迅速解剖,取出肠道、肝脏等组织,液氮速冻后于 -80 °C 保存,用于消化酶活性测定和相关基因的表达分析。每个重复组随机取出 3 尾鱼用作全鱼体成分分析;每个重复组随机取 3 尾鱼肝脏和前肠浸于 10%福尔马林内固定 24 h,用于切片制作。

1.5 鱼体成分和摄食量的测定

利用马弗炉 550 °C 灼烧法测定鱼体灰分含量(GB/T 5009.4-1985)^[25];采用凯氏定氮法测定粗蛋白含量(GB/T 0059.5-1985,海能仪器有限公司 K1100

全自动凯定氮仪)^[26]; 采用索氏抽提(T5009.6-1985, 海能仪器有限公司 SOX500 脂肪测定仪)测定粗脂肪含量^[27]; 采用常压干燥法测定鱼体水分含量。实验期间每天记录投喂饵料量, 第 30 天、60 天、90 天和第 120 天统计总投喂饵料重量 $F(g)$ 。摄食量公式为: $D \text{ 日摄食量} = F/[n(t_2 - t_1)]$, 其中 n 为鱼尾数, t_1 、 t_2 为实验时间(d), F 为总投喂量(g)。

1.6 肠道消化酶活的测定

肠道淀粉酶(AMS)和脂肪酶(LPS)活力采用南京建成生物工程研究所生产试剂盒进行测定。测定方法依据试剂盒说明书进行。组织蛋白浓度用考马斯亮蓝染色法测定。

1.7 肝脏和肠道组织切片制作

肠道切片采用常规石蜡切片制作方法, 经过梯度酒精 70% (2 h)、80% (2 h)、90% (2 h)、95% 酒精(I、II 各 2 h)和无水酒精(I、II 各 1 h)脱水, 二甲苯透明(I、II 各 1 h), 经过包埋后将蜡块固定于切片机(德国, Leica RM2235), 切成 5 μm 厚的切片, 二甲苯脱蜡, 苏木精-伊红染色, 再进行梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片后, 组织切片用 Leica DFC550 显微镜观察并拍照。切片制作过程使用仪器包括切片机、包埋机、自动脱水机、自动染色机(德国, Leica RM2235)。

1.8 肝脏 HL、LPL 基因表达量的测定

按照 TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit 试剂盒说明书提取肝脏总 RNA, 通过电泳检测 RNA 的完整性。采用 TaKaRa Prime ScriptTM 1st strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒合成 cDNA, 并置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存待用。应用 Primer Premier 5.0 设计引物, 根据 NCBI 获得的大口黑鲈转录组数据及其相关基因的全长序列设计特异性引物, 所有引物均由苏州金唯智生物科技有限公司合成, 扩增片段长度为 150~200 bp (表 1)。

HL、LPL、18S RNA 和 β -actin 的表达量采用 TaKaRa TB Green TM Fast qPCR Mixc 测定, 进行 RT-PCR 反应, 然后采用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行实时定量 PCR 扩增反应, 荧光定量 PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 然后 40 个循环: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 熔解反应条件为 65~95 $^{\circ}\text{C}$ 。反应结

表 1 实时定量 PCR 引物
Tab. 1 Gene-specific real-time quantitative PCR primers

基因 gene	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')
HL	(F) GAGCAGCGTCAACTCAACAA
	(R) TCAAACGATACGAGATAGACAACA
LPL	(F) GAGGATTCATCTGCTGGGTAC
	(R) CGTCATCTTTGGACAGGGTG
18S RNA	(F) GGACACGGAAAGGATTGACAG
	(R) CGGAGTCTCGTTTCGTTATCGG
β -actin	(F) ATCGCCGCACTGGTTGTTGAC
	(R) CCTGTTGGCTTTGGGGTTC

束后确认 RT-PCR 的扩增曲线和熔解曲线。以 β -actin 和 18S RNA 为内参, 对得到的各样品 Ct 值进行均一化处理, 以 2 次/d 组各基因的 mRNA 水平为基准, 应用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法确定不同频率组相对应 mRNA 的相对表达量。

1.9 数据处理

采用 SPSS 22.0 软件进行数据统计分析。先对实验数据进行单因素方差分析(one-way ANOVA), 若差异显著($P < 0.05$), 再进行 LSD 和 Tukey 氏法多重比较。数据均以平均值 $\pm$ 标准误($\bar{x} \pm SE$)表示。

2 结果与分析

2.1 投喂频率对大口黑鲈摄食及体成分的影响

不同投喂频率组大口黑鲈摄食及体成分见表 2。由表 2 可以看出, 投喂频率显著影响大口黑鲈体粗脂肪和灰分含量($P < 0.05$)。2 次/d 投喂组大口黑鲈体粗脂肪含量显著低于 4 次/d 组, 而灰分含量显著高于 3 次/d 组和 4 次/d 组。体水分和粗蛋白含量均未受到投喂频率的影响($P > 0.05$)。从表中可看出实验后期 4 次/组的摄食量显著低于其他两组($P < 0.05$), 不同投喂频率对大口黑鲈摄食量具有显著的影响。

2.2 投喂频率对大口黑鲈消化酶活性的影响

由图 1 可知, 第 30 天和 60 天时, 投喂频率对大口黑鲈肠道淀粉酶无显著影响($P > 0.05$), 而在第 90 天和 120 天时, 2 次/d 组显著高于其他两组($P < 0.05$); 第 30 天、60 天和 90 天时, 投喂频率对肠道脂肪酶无显著影响($P > 0.05$), 而在 120 天时, 2 次/d 组肠道脂肪酶活性显著高于 4 次/d 组($P < 0.05$)。

表 2 投喂频率对大口黑鲈摄食及体成分的影响
Tab. 2 Effects of feeding frequency on boby composition and feeding of *Micropterus salmoides*
 $n=20; \bar{x} \pm SE$

项目 item	时间/d time	组别 group		
		2 次/d	3 次/d	4 次/d
水分/% moisture	30	72.24±0.74	72.2±0.53	70.53±0.46
	60	69.18±0.63	69.12±0.47	69.35±0.34
	90	72.95±0.24	73.04±0.34	72.83±0.62
	120	69.98±0.74	70.58±0.15	70.51±0.26
粗蛋白质/% crude protein	30	18.54±0.85	19.16±0.64	18.43±0.42
	60	20.63±0.94	19.97±1.64	20.38±1.35
	90	19.46±1.01	18.74±1.61	19.52±0.31
	120	19.82±0.56	19.92±1.39	19.75±1.64
粗脂肪/% crude lipid	30	5.10±1.06	6.40±0.32	6.02±0.24
	60	8.41±0.28 ^b	8.20±0.44 ^b	9.50±0.36 ^a
	90	7.50±0.32 ^b	7.01±0.34 ^b	8.02±0.58 ^a
	120	6.60±0.67 ^b	8.83±0.52 ^b	9.58±0.78 ^a
灰分/% ash	30	3.10±0.12	2.90±0.23	3.00±0.09
	60	3.30±0.21 ^a	3.10±0.08 ^a	2.60±0.24 ^b
	90	4.40±0.33 ^a	4.10±0.24 ^{ab}	3.50±0.45 ^b
	120	3.72±0.12 ^a	3.51±0.23 ^a	2.80±0.39 ^b
日摄食量/g daily food intake	30	0.51±0.03	0.51±0.02	0.52±0.03
	60	1.12±0.07	1.14±0.07	1.18±0.08
	90	1.96±0.07 ^a	1.98±0.06 ^a	1.09±0.08 ^b
	120	1.78±0.05 ^a	1.93±0.09 ^a	1.00±0.03 ^b

注：同行中上标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。
Note: Different superscript small letters in the same column mean significant difference ($P<0.05$).

2.3 投喂频率对大口黑鲈肝脏和肠道组织的影响

由表 3 可知, 投喂频率对大口黑鲈肠道肌层厚度有显著影响。2 次/d 组肠道肌层厚度明显高于其他两组($P<0.05$)。肠道绒毛高度、绒毛宽度均未受到投喂频率的影响($P>0.05$)。由图 2 可见,

表 3 投喂频率对大口黑鲈肠道形态的影响
Tab. 3 Effects of feeding frequency on intestinal tissue morphology of *Micropterus salmoides*
 $n=20; \bar{x} \pm SE$

项目 item	时间/d time	组别 groups		
		2 次/d	3 次/d	4 次/d
肌层厚度/ μm thickness of muscle layer	120	195.58±6.17 ^a	169.89±9.63 ^b	149.55±5.67 ^b
绒毛高度/ μm height of villus	120	691.79±15.43	687.72±17.17	682.84±16.17
绒毛宽度/ μm width of villus	120	212.87±9.24	199.91±21.37	203.97±7.49

注：同行中上标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。
Notes: Different superscript small letters in the same column mean significant difference ($P<0.05$).

2.4 投喂频率对大口黑鲈肝脏中 *HL* 和 *LPL* 基因相对表达量的影响

由图 3 可知, 大口黑鲈肝脏 *HL* 和 *LPL* 基因

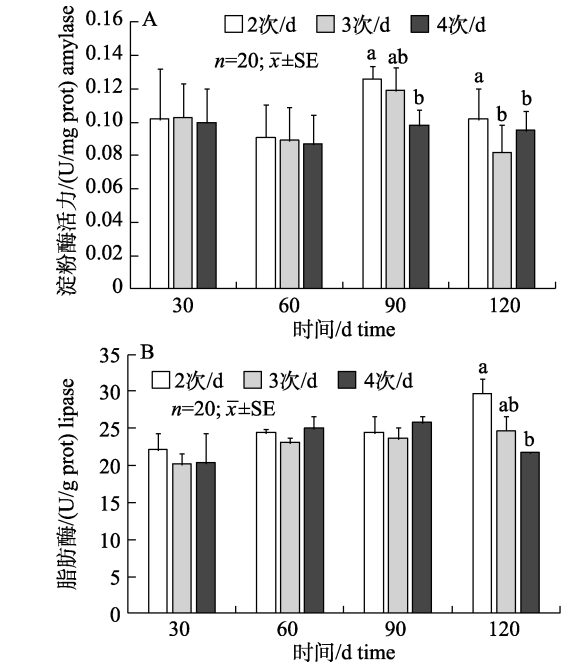


图 1 不同投喂频率对大口黑鲈肝脏消化酶的影响
柱形图上方不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。
Fig. 1 Effects of different feeding frequency on liver digestive enzyme activity of *Micropterus salmoides*
Different letters on the column indicate significant difference ($P<0.05$).

2 次/d 组肠道黏膜结构完整, 绒毛排列整齐。肝脏切片中 4 次/d 组可见明显的脂肪沉积, 2 次/d 组肝脏脂肪滴、细胞空泡化明显减少, 而 4 次/d 组细胞核偏移严重空泡化明显, 肝细胞空泡化现象加剧, 细胞内脂肪堆积推动细胞核偏移, 大片细胞核消失, 肝细胞轮廓不清晰。

的相对表达量受到投喂频率的影响。在第 60 天和 90 天, 2 次/d 组 *LPL* 基因的相对表达量显著高于 4 次/d 组($P<0.05$), 而在第 30 天和 120 天时, *LPL*

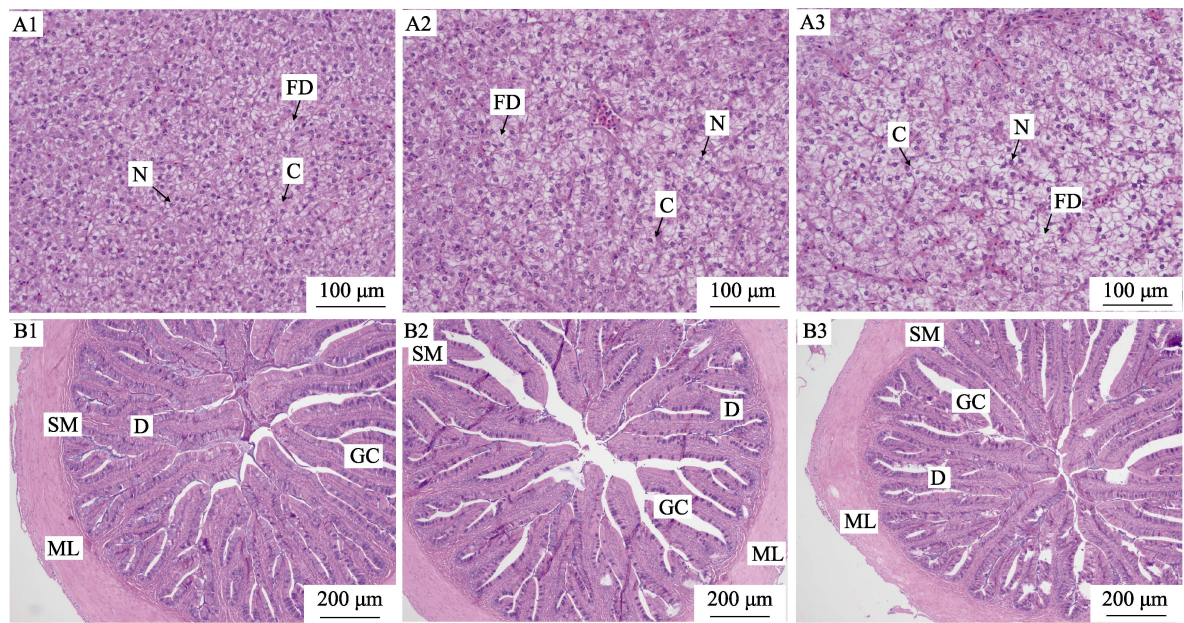


图 2 不同投喂频率对大口黑鲈肝脏(A1、A2、A3)和肠道(B1、B2、B3)组织结构的影响
A1: 2 次/d 组; A2: 3 次/d 组; A3: 4 次/d 组; FD: 脂肪滴; N: 细胞核; C: 细胞膜. B1: 2 次/d 组; B2: 3 次/d 组; B3: 4 次/d 组; ML: 肌层; SM: 黏膜下层; D: 肠绒毛; GC: 杯状细胞.
Fig. 2 Effects of different feeding frequency on liver and intestinal tissue morphology of *Micropterus salmoides*
A1: 2 times/d; A2: 3 times/d; A3: 4 times/d; FD: fat droplet; N: nucleus; C: cell membrane; B1: 2 times/d; B2: 3 times/d; B3: 4 times/d; ML: muscularis; SM: submucosa; D: duplicature; GC: goblet cell.

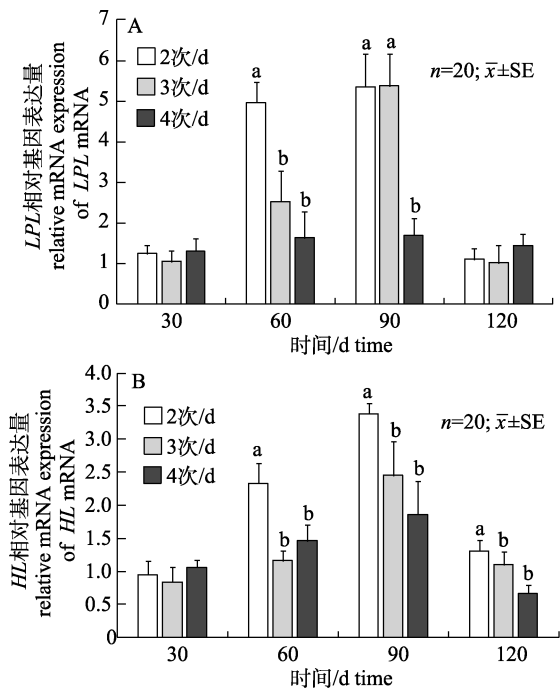


图 3 不同投喂频率对大口黑鲈肝脏 LPL 基因和 HL 基因相对表达量的影响
柱形图上方不同小写字母表示差异显著($P<0.05$).
Fig. 3 Effects of feeding frequency on expressions of LPL and HL in liver of *Micropterus salmoides*
Different letters on the column indicate significant difference ($P<0.05$).

基因的相对表达量在各处理组间差异不显著 ($P>0.05$)。在第 60 天、90 天和 120 天时, 2 次/d 组 HL 基因表达量显著高于 3 次/d 和 4 次/d 组 ($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 投喂频率对大口黑鲈摄食及体成分的影响

养殖鱼类由内源和外源因素同时影响其体成分组成^[28]。在本研究中, 大口黑鲈鱼体脂肪含量随着投喂频率从 2 次/d 增至 4 次/d 而升高。虹鳟投喂频率实验发现, 鱼体脂肪含量随投喂次数的增加而增加^[29]。过高的投喂频率使得鱼类摄入更多的食物, 用于鱼类正常生长后的过量能量会转化为脂肪在肝脏和肌肉储存, 随之提升鱼体脂肪水平^[30-32]。本研究结果表明, 2 次/d 投喂组的体灰分含量显著高于其他两组, 花鲈(*Lateolabrax maculatus*)^[33]、金鲳(*Trachinotus ovatus*)^[34]等的研究亦发现同样的结果, 灰分含量随投喂频率的升高而降低。本研究中, 2 次/d、3 次/d 和 4 次/d 投喂组之间鱼体水分含量无差异, 而花鲈^[33]和团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)^[31,35]体水分含量随投喂频率升高而降

低,投喂频率对鱼体成分的影响可能与鱼种类的不同、大小差异有关。大口黑鲈鱼体粗蛋白与投喂频率无关,许多研究发现鱼体蛋白含量受投喂频率的影响不显著,如团头鲂^[35]和南方鲇(*Silurus meridionalis*)^[36]等。

本研究全程采用饱食投喂法,从日摄食数据可看出实验前期投喂 60 d 的摄食量差异不明显,第 90~120 天 4 次/d 组的摄食量要低于其他两组,投喂次数增多而摄食量减少,前期投喂频率对大口黑鲈的摄食量和体成分的影响并不明显,有研究报道投喂次数较少的实验鱼,通过增加自身的胃部容量来达到每顿摄入更多食物的目的,从而食欲增大^[37],行为观察表现为活跃度高、更频繁地觅食。有研究报道四齿鲃科(Tetraodontidae)鱼类随着投喂频率的增高,摄食量反而变小^[38]。尽管以较高的频率喂食投喂次数多,但进餐间隔短,食物通过消化道的速度更快,导致消化的效率降低^[39]。因此,确定最佳投喂频率对提高摄食效率具有重要意义。从各实验组大口黑鲈的生长数据看出,不同投喂频率组 2 次/d 组、3 次/d 组、4 次/d 组生长率分别为 1.06%、0.91%、0.71%,每天投喂两次组的特定生长率明显高于每天投喂 4 次组^[23],每天投喂 4 次组的大口黑鲈,生长受到抑制可能与养殖后期摄食量下降有关,投喂频率不当,不仅导致鱼体脂肪含量升高加重肝脏脂肪代谢负担,还会导致后期摄食量降低,活跃度降低,不利于鱼的健康。

3.2 投喂频率对大口黑鲈肠道消化酶活性的影响

鱼类肠道消化酶的活性反映了鱼类的消化能力,其影响鱼类对营养物质和能量吸收利用^[40]。本研究发现,投喂频率对大口黑鲈脂肪酶和淀粉酶产生了显著性影响。2 次/d 投喂组肠道脂肪酶高于 4 次/d 组,说明在饱饲投喂条件下,2 次/d 投喂组大口黑鲈进食相隔时间长,鱼体会通过促进消化酶的分泌等方式,促进营养物质的吸收,以保障鱼体的正常新陈代谢^[41]。而在较高的投喂频率条件下,大口黑鲈的进食时间间隔短,食物来源充足,较低水平的消化酶活力即能满足其正常生长所需的营养。本研究中大口黑鲈肠道淀粉酶

活性随投喂频率的增加而下降,与研究者对条石鲷幼鱼(*Oplegnathus fasciatus*)^[42]和许氏平鲷^[43](*Sebastes schlegeli*)的研究发现肠道淀粉酶活性与投喂频率成反比一致。而不同投喂频率对奥尼罗非鱼(*Oreochromis niloticus*×*O. aureus*)^[44]和大黄鱼(*Larimichthys crocea*)^[45]的淀粉酶活性无显著性影响,上述差异可能与鱼类食性、养殖条件等差异而有关。

3.3 投喂频率对大口黑鲈肝脏和肠道组织健康的影响

肝脏和肠道分别为鱼类代谢和消化吸收营养物质的重要部位,间接反映了生长代谢的状态。本实验中,肠道组织切片结果显示,投喂 2 次/d 组的肌层厚度显著厚于 4 次/d 组,而绒毛长度和绒毛宽度未见差异。肠道中肌层厚度反映肠道的收缩能力,肌层厚度增加收缩能力强,有利于肠道吸收和消化营养物质^[46]。4 次/d 投喂组大口黑鲈肠道脂肪酶活性下降,而且会破坏肠道组织的完整性,肌层厚度变薄,肠道绒毛排列整齐度低。Imsland 等^[47]对海参斑(*Cyclopterus lumpus* L.)的研究发现,每周喂 7 d 的肠道组织炎症较每周喂 4 d、每周 3 d 的两组严重,这说明适当的投喂频率可维持肠道健康。

在本研究中,2 次/d 组、3 次/d 组和 4 次/d 组的大口黑鲈肝脏均出现脂肪滴、细胞核透明空泡化的现状。在投喂频率较高的 4 次/d 组脂肪变性空泡化细胞核偏离较为严重。与 2 次/d 组、3 次/d 组相比,4 次/d 组肝细胞透明空泡化、脂肪堆积严重,细胞核逐渐消失,肝细胞轮廓模糊。这与 Huang 等^[48]对吉富罗非鱼的研究发现过高的投喂频率会导致鱼体肝脏的损伤一致。Shearer 等^[49]对大鳞大麻哈鱼(*Oncorhynchus tshawytscha*)的研究结果显示,随着投喂频率增高,更多的食物能量被转化为脂肪在肝脏内积聚,从而引起肝脏病变以及增加鱼类患脂肪肝的风险。对金头鲷(*Sparus aurata*)的研究也有相似的结果,随着投喂频率的增高,肝细胞的空泡化程度越高,可能每天投喂频率高的鱼在肝脏中储存过量的脂肪,引起肝细胞空泡化^[50]。

3.4 投喂频率对大口黑鲈肝脏中 *HL* 和 *LPL* 基因表达丰度的影响

肝脂酶(*HL*)和脂蛋白脂肪酶(*LPL*)是脂肪代谢有关的两种关键酶, *HL* 和 *LPL* 酶活性的降低与动脉粥样硬化和脂肪肝有关^[51]。鱼体肝脏中 *LPL* 表达水平高低, 决定肝脏组织脂质底物配额的多少作为体脂贮备起来或者作为能源消耗^[52]。本研究中, 在第 60~90 天时, 2 次/d 组大口黑鲈肝脏 *LPL* 基因表达量高于 3 次/d 组和 4 次/组, 说明每天投喂 2 次的大口黑鲈, 诱导了 *LPL* 分泌活性上升, 水解甘油三酯为机体提供能量。禁食、激素、投喂方式、饲喂高脂食物都会引起 *LPL* mRNA 的特异表达^[18]。动物摄食方式会影响 *LPL* 活性。AmayaAlbalat 等^[19]发现虹鳟在禁食和喂食后 *LPL* 活性变化; 梁旭方等^[53]也得到了类似的研究结果。而在第 120 天时, 投喂频率对肝脏 *LPL* 基因表达量无显著影响, 说明投喂频率对肝脏 *LPL* 基因表达量的影响与鱼生长阶段有关。

目前有关鱼类脂肪肝的诱因报道主要在饲料配方方面, 而有关投喂频率影响脂肪代谢的研究报道尚少。本研究中, 在第 60 天、90 天和 120 天时, 2 次/d 投喂组大口黑鲈肝脏 *HL* 基因表达量明显高于 3 次/d 组和 4 次/d 组。而黄秀芸等^[20]对吉富罗非鱼研究发现, 投喂 3 次/d 的吉富罗非鱼 *HL* 基因表达水平高于投喂 2 次/d 组。出现以上结果可能是鱼类种属不同。张蕊等^[54]研究认为分布在肝脏中的 *HL* 的主要特点是 *HL* 与 *HSPG* 起配体作用“捕捉”多种脂蛋白, *HL* 基因表达量水平的提高可防治脂肪肝, 本研究表明, 每天投喂 2 次有利于大口黑鲈的脂质代谢。

参考文献:

- [1] Tsunoda H, Mitsuo Y. Variations in piscivory of invasive largemouth bass *Micropterus salmoides*, associated with pond environments[J]. Limnology, 2018, 19(3): 271-276.
- [2] Harimana Y, Tang X, Xu P, et al. Effect of long-term moderate exercise on muscle cellularity and texture, antioxidant activities, tissue composition, freshness indicators and flavor characteristics in largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. Aquaculture, 2019, 510: 100-108.
- [3] Ebeling J M, Timmons M B. Recirculating aquaculture systems[M]//Aquaculture Production Systems. Oxford: Wiley-Blackwell, 2012: 245-277.
- [4] Timmons N, Timmons M B, Ebeling J M. Recirculating aquaculture system (RAS) technologies. 2. [J]. Aquaculture Magazine, 2006, 32(5): 32-39.
- [5] Deviller G, Palluel O, Aliaume C, et al. Impact assessment of various rearing systems on fish health using multibiomarker response and metal accumulation[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2005, 61(1): 89-97.
- [6] Resley M J, Webb K A Jr, Holt G J. Growth and survival of juvenile cobia, *Rachycentron canadum*, at different salinities in a recirculating aquaculture system[J]. Aquaculture, 2006, 253(1-4): 398-407.
- [7] Mansfield G S, Desai A R, Nilson S A, et al. Characterization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestinal microbiota and inflammatory marker gene expression in a recirculating aquaculture system[J]. Aquaculture, 2010, 307(1-2): 95-104.
- [8] Burr G S, Wolters W R, Schrader K K, et al. Impact of depuration of earthy-musty off-flavors on fillet quality of Atlantic salmon, *Salmo salar*, cultured in a recirculating aquaculture system[J]. Aquacultural Engineering, 2012, 50: 28-36.
- [9] Calone R, Pennisi G, Morgenstern R, et al. Improving water management in European catfish recirculating aquaculture systems through catfish-lettuce aquaponics[J]. Science of the Total Environment, 2019, 687: 759-767.
- [10] Guo Z X, Cui J Y, Li M, et al. Effect of feeding frequency on growth performance, antioxidant status, immune response and resistance to hypoxia stress challenge on juvenile dolly Varden char *Salvelinus malma*[J]. Aquaculture, 2018, 486: 197-201.
- [11] Zhao S B, Han D, Zhu X, et al. Effects of feeding frequency and dietary protein levels on juvenile allogynogenetic gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) var. CAS III: Growth, feed utilization and serum free essential amino acids dynamics[J]. Aquaculture Research, 2016, 47(1): 290-303.
- [12] Petursdottir T E. Influence of feeding frequency on growth and size dispersion in Arctic charr *Salvelinus alpinus* (L.)(J). Aquaculture Research, 2002, 33(7): 543-546.
- [13] Bureau D P, Hua K, Cho C Y. Effect of feeding level on growth and nutrient deposition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) growing from 150 to 600 g[J]. Aquaculture Research, 2006, 37(11): 1090-1098.
- [14] Yang F. Animal Nutrition[M]. 2nd Edition. Beijing: China Agriculture Press, 2003: 76-88. [杨凤. 动物营养学[M]. 2 版. 北京: 中国农业出版社, 2003: 76-88.]
- [15] Akiyoshi H, Inoue A. Comparative histological study of teleost livers in relation to phylogeny [J]. Zoological Science, 2004, 21(8): 841-850.

- [16] Verhoeven A J, Neve B P, Jansen H. Secretion and apparent activation of human hepatic lipase requires proper oligosaccharide processing in the endoplasmic reticulum[J]. *The Biochemical Journal*, 1999, 337(Pt 1): 133-140.
- [17] Oku H, Koizumi N, Okumura T, et al. Molecular characterization of lipoprotein lipase, hepatic lipase and pancreatic lipase genes: Effects of fasting and refeeding on their gene expression in red sea bream *Pagrus major*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2006, 145(2): 168-178.
- [18] Liang X F, Ogata H Y, Oku H. Effect of dietary fatty acids on lipoprotein lipase gene expression in the liver and visceral adipose tissue of fed and starved red sea bream *Pagrus major*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2002, 132(4): 913-919.
- [19] Albalat A, Sánchez-Gurmaches J, Gutiérrez J, et al. Regulation of lipoprotein lipase activity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) tissues[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2006, 146(3): 226-235.
- [20] Huang X Y. Farmed tilapia's HL and LPL gene cloning and tilapia feed level of choline and fatty, feeding frequency and effects of feeding levels on its expression in the liver[D]. Nanning: Guangxi University, 2015. [黄秀芸. 吉富罗非鱼 HL、LPL 基因克隆及饲料胆碱和脂肪水平、投饲频率和投喂水平对其在肝脏中表达的影响[D]. 南宁: 广西大学, 2015.]
- [21] El-Saidy D M S D, Gaber M M A. Effect of dietary protein levels and feeding rates on growth performance, production traits and body composition of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) cultured in concrete tanks[J]. *Aquaculture Research*, 2005, 36(2): 163-171.
- [22] Fiogbé E D, Kestemont P. Optimum daily ration for Eurasian perch *Perca fluviatilis* L. reared at its optimum growing temperature[J]. *Aquaculture*, 2003, 216(1-4): 243-252.
- [23] Xie S M, Wang Y Y, Nie Z J, et al. Effects of feeding frequency on the growth, physiology and expression abundance of *IGF-I* and *GH* mRNA in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) reared in in-pond raceway culture systems[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2020, 27(4): 363-374. [谢苏明, 王裕玉, 聂志娟, 等. 投喂频率对池塘工程化循环水养殖大口黑鲈生长、生理及肝脏 *GH*、*IGF-I* 基因表达丰度的影响[J]. 中国水产科学, 2020, 27(4): 363-374.]
- [24] National Environmental Protection Agency. GB 11607-1989 Water quality standard for fisheries[S]. Beijing: Standards Press of China, 1989. [国家环境保护局. GB 11607-1989 渔业水质标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 1989.]
- [25] General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. GB/T 5009. 4-1985 Determination of ash in foods[S]. Beijing: Standards Press of China, 1985. [国家质检总局. GB/T 5009. 4-1985 食品中灰分的测定方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 1985.]
- [26] General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. GB/T 0059. 5-1985 Method for determination of protein in foods[S]. Beijing: Standards Press of China, 1985. [国家质检总局. GB/T 0059.5-1985 食品中蛋白质的测定方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 1985.]
- [27] General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. GB/T 5009. 6-1985 Method for determination of fat in foods[S]. Beijing: Standards Press of China, 1985. [国家质检总局. GB/T 5009.6-1985 食品中脂肪的测定方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 1985.]
- [28] Shearer K D. Factors affecting the proximate composition of cultured fishes with emphasis on salmonids[J]. *Aquaculture*, 1994, 119(1): 63-88.
- [29] Ruohonen K, Vielma J, Grove D J. Effects of feeding frequency on growth and food utilisation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed low-fat herring or dry pellets[J]. *Aquaculture*, 1998, 165(1-2): 111-121.
- [30] Cho S H, Lim Y S, Lee J H, et al. Effects of feeding rate and feeding frequency on survival, growth, and body composition of ayu post-larvae *Plecoglossus altivelis*[J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2003, 34(1): 85-91.
- [31] Lin Y, Miao L H, Ge X P, et al. Effects of feeding frequency on growth performance, muscle quality and plasma biochemical indices of *Megalobrama amblycephala* juvenile[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2015, 27(9): 2749-2756. [林艳, 缪凌鸿, 戈贤平, 等. 投喂频率对团头鲂幼鱼生长性能、肌肉品质和血浆生化指标的影响[J]. 动物营养学报, 2015, 27(9): 2749-2756.]
- [32] Wang J T, Liu Y J, Tian L X, et al. Effect of dietary lipid level on growth performance, lipid deposition, hepatic lipogenesis in juvenile cobia (*Rachycentron canadum*)[J]. *Aquaculture*, 2005, 249(1-4): 439-447.
- [33] Wang W, Zhang K Q, Wen H S, et al. Effects of feeding frequency on gastric evacuation, growth performance and body composition of juvenile *Lateolabrax maculatus*[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2018, 48(6): 55-62. [王伟, 张凯强, 温海深, 等. 投喂频率对花鲈幼鱼胃排空、生长性能和体组分的影响[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2018, 48(6): 55-62.]
- [34] Wu Y B, Han H, Qin J G, et al. Effect of feeding frequency on growth, feed utilization, body composition and waste output of juvenile golden pompano (*Trachinotus ovatus*) reared in net pens[J]. *Aquaculture Research*, 2015, 46(6): 1436-1443.

- [35] Tian H Y, Zhang D D, Li X F, et al. Optimum feeding frequency of juvenile blunt snout bream *Megalobrama amblycephala*[J]. Aquaculture, 2015, 437: 60-66.
- [36] He L J, Xie X J, Ai Q H. Effects of feeding frequency on feeding rate, growth and feed conversion efficiency for the southern catfish, *Silurus meridionalis*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2003, 27(4): 434-436. [何利君, 谢小军, 艾庆辉. 饲喂频率对南方鲇的摄食率、生长和饲料转化效率的影响[J]. 水生生物学报, 2003, 27(4): 434-436.]
- [37] 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.
- [38] Ishiwata N. Ecological studies on the feeding of fishes—VIII. Frequency of feeding and satiation amount[J]. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 1969, 35(10): 979-984.
- [39] 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.
- [40] Thongprajukaew K, Kovitvadhi U, Kovitvadhi S, et al. Effects of different modified diets on growth, digestive enzyme activities and muscle compositions in juvenile Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910)[J]. Aquaculture, 2011, 322-323: 1-9.
- [41] Thongprajukaew K, Kovitvadhi S, Kovitvadhi U, et al. Effects of feeding frequency on growth performance and digestive enzyme activity of sex-reversed Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)[J]. Agriculture and Natural Resources, 2017, 51(4): 292-298.
- [42] Song G, Peng S M, Sun P, et al. Effects of starvation, refeeding, and feeding frequency on growth and digestive enzyme activity of *Oplegnathus fasciatus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(6): 1269-1277. [宋国, 彭士明, 孙鹏, 等. 饥饿与再投喂及投喂频率对条石鲷幼鱼生长和消化酶活性的影响[J]. 中国水产科学, 2011, 18(6): 1269-1277.]
- [43] Mao S Q, Zou M Y, Wang C S, et al. Optimal feeding frequency for *Sebastes schlegelii* juveniles[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2014, 26(8): 2379-2385. [冒树泉, 邹明好, 王春生, 等. 许氏平鲉幼鱼适宜投喂频率的研究[J]. 动物营养学报, 2014, 26(8): 2379-2385.]
- [44] Qiang J, Wang H, Li R W L, et al. Effects of feeding frequency on growth, body biochemical composition and digestive enzymes of larvae and juvenile of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*)[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2009, 29(4): 79-83. [强俊, 王辉, 李瑞伟, 等. 饲喂频率对奥尼罗非鱼仔稚鱼生长、体成分和消化酶活力的影响[J]. 广东海洋大学学报, 2009, 29(4): 79-83.]
- [45] Xie F J, Ai Q H, Mai K S, et al. The optimal feeding frequency of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*, Richardson) larvae[J]. Aquaculture, 2011, 311(1-4): 162-167.
- [46] Caspary W F. Physiology and pathophysiology of intestinal absorption[J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 1992, 55(1): 299S-308S.
- [47] Imsland A K D, Reynolds P, Jonassen T M, et al. Effects of different feeding frequencies on growth, cataract development and histopathology of lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.) [J]. Aquaculture, 2019, 501: 161-168.
- [48] Huang Q, Huang K, Ma Y Q, et al. Feeding frequency and rate effects on growth and physiology of juvenile genetically improved farmed Nile tilapia[J]. North American Journal of Aquaculture, 2015, 77(4): 503-512.
- [49] Shearer K D, Silverstein J T, Dickhoff W W. Control of growth and adiposity of juvenile Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*)[J]. Aquaculture, 1997, 157(3-4): 311-323.
- [50] Caballero M J, Izquierdo M S, Kjorsvik E, et al. Histological alterations in the liver of sea bream, *Sparus aurata* L., caused by short- or long-term feeding with vegetable oils. Recovery of normal morphology after feeding fish oil as the sole lipid source[J]. Journal of Fish Diseases, 2004, 27(9): 531-541.
- [51] Hu Y L, Liang X F, Li G G, et al. Cloning and sequence analysis of hepatic lipase (HL) and lipoprotein lipase (LPL) gene in orange spotted grouper (*Epinephelus coioides*)[J]. Journal of Jinan University (Natural Science & Medicine Edition), 2010, 31(5): 520-527. [胡永乐, 梁旭方, 李观贵, 等. 斜带石斑鱼肝脂酶和脂蛋白脂酶基因克隆与序列分析[J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版), 2010, 31(5): 520-527.]
- [52] Yamada S, Iida T, Tabata T, et al. Alcoholic fatty liver differentially induces a neutrophil-chemokine and hepatic necrosis after ischemia-reperfusion in rat[J]. Hepatology, 2000, 32(2): 278-288.
- [53] Liang X F, Oku H, Ogata H Y, et al. The cDNA sequence and tissue expression of lipoprotein lipase gene of a marine fish, red sea bream (*Pagrus major*)[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2002, 18(6): 712-719. [梁旭方, Oku H, Ogata H Y, 等. 海水鱼真鲷脂蛋白脂肪酶基因 cDNA 序列与组织表达[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2002, 18(6): 712-719.]
- [54] Zhang R, Cui R Z, Li Z C. The synthesis, structure and function of hepatic lipase[J]. Molecular Cardiology of China, 2006, 6(2): 111-114. [张蕊, 崔让庄, 李忠诚. 肝脂酶的合成、结构和功能[J]. 中国分子心脏病学杂志, 2006, 6(2): 111-114.]

Effects of feeding frequency on digestive enzymes, histomorphology, and gene expression of lipid metabolic enzymes of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) reared in in-pond raceway culture systems

XIE Suming¹, XU Gangchun^{1,2}, WANG Yuyu², NIE Zhijuan², SUN Yi², LI Quanjie²

1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China

Abstract: A 120-day growth trial was conducted to evaluate the effects of different feeding frequencies on intestinal and liver tissues, and the expression of *HL* and *LPL* mRNA in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) reared in in-pond raceway culture systems (IPRS). Largemouth bass with an initial average body weight of (5.0 ± 0.4) g were randomly divided into three groups (fed two, three, and four times/day). The results showed that fish fed twice a day had significantly higher ash rate ($P < 0.05$), but the crude protein was not significantly different ($P > 0.05$). The crude lipid content in fish fed twice a day was significantly higher than that in the other groups ($P < 0.05$), while the moisture content did not significantly differ among the three groups ($P > 0.05$). The feeding frequency had a significant effect on intestinal amylase and lipase activity ($P < 0.05$). Fish fed twice a day had higher intestinal amylase and lipase activity than those fed four times/d on days 90 and 120 ($P < 0.05$). The intestinal tissue of fish fed four times/d appeared to have a thinner muscular layer while the villi integrity decreased. Fish fed two times/d had a thicker muscle layer than those fed four times/d. From liver histological observations, more severe liver fat accumulation leads to more serious liver damage with increasing feeding frequency. Fish fed four times/d had much higher occurrence rates of the hepatocyte vacuolization and nuclei shifting to the cellular periphery than fish fed at other frequencies. Feed frequency had a significant effect on *HL* and *LPL* mRNA expression in *M. salmoides*. Fish fed two times/d exhibited higher *LPL* mRNA expression on days 60 and 90 ($P < 0.05$), while no significant difference was found on day 120. Fish fed two times/d exhibited higher *HL* mRNA expression than those fed three times/d and four times/d at a fixed feeding rate ($P < 0.05$). Based on growth, intestinal and liver tissues, and *HL* and *LPL* expression levels, the optimal feeding frequency of *M. salmoides* reared in IPRS is twice a day. These data are necessary for optimizing the culture conditions and feeding management strategy in IPRS culture operations.

Key words: *Micropterus salmoides*; feeding frequency; in-pond raceway culture systems (IPRS); intestinal digestion; gene expression levels

Corresponding author: XU Gangchun. E-mail: xugc@ffrc.cn