

DOI: 10.12264/JFSC2023-0104

稻鲈共作系统中养殖密度对大口黑鲈抗氧化状态、肌肉营养品质和代谢功能的影响

丁崇航¹, 贾睿², 侯诒然², 李冰², 朱健^{1,2}

1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 200120;

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业农村部稻渔综合种养生态重点实验室, 江苏 无锡 214081

摘要: 为探究稻渔综合种养模式中养殖密度对大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)抗氧化状态、肌肉营养品质和代谢功能的影响, 以初始体重为(40.63±0.13) g 的大口黑鲈为研究对象, 设置低密度组(40 g/m³)和高密度组(120 g/m³), 每个密度设 3 个重复, 养殖 90 d。养殖结束后采集肌肉组, 测定生化指标, 并进行代谢组和转录组测序分析。结果显示, 高密度组肌肉总抗氧化能力(T-AOC)显著低于低密度组; 游离氨基酸中, 高密度组丙氨酸、组氨酸含量显著下降, 而鲜味氨基酸含量显著增加; 脂肪酸组成中, 高密度组 Σ SFA、 Σ MUFA、 Σ PUFA 以及 n-6 PUFA 含量显著增加, 而 n-3 PUFA/n-6 PUFA 值降低。代谢组学结果显示, 不同密度组间共鉴定出 186 个差异显著代谢物, 主要富集于不饱和脂肪酸的生物合成、苯丙氨酸代谢、烟酸和烟酰胺代谢以及戊糖和葡萄糖醛酸的相互转化等代谢通路。转录组学结果显示, 不同密度组间共鉴定出 688 个显著差异表达基因, 主要富集于细胞过程、代谢过程、ECM-受体相互作用、PI3K-Akt 信号通路、蛋白质消化吸收等途径中。综上所述, 稻-鲈共作模式下高养殖密度影响大口黑鲈肌肉抗氧化状态、肌肉营养风味, 以及脂质、糖类物质和蛋白质的代谢功能; 同时大口黑鲈通过调节代谢功能以及上调胞内信号通路以适应环境胁迫。

关键词: 稻鱼共作; 大口黑鲈; 养殖密度; 营养成分; 代谢组学; 胁迫

中图分类号: S964

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2023)08-1000-15

稻渔综合种养是一种从传统稻田养殖发展而来的环保农业模式, 具有环境可持续性和较高的生态效益^[1]。稻田生态系统具有一定的自我调节功能, 能够为鱼类提供稳定安全的生存环境及食物来源, 同时鱼类活动可减少稻田病虫害发生并提供有机肥料。稻渔综合种养实现了提质增效以及生态环保的双重效益^[2]。2021 年, 我国稻渔综合种养面积达 264.4 万 hm², 水产品产量约 3.56×10⁹ kg, 占淡水养殖产量的 11%以上。现有研究表明, 在稻田养殖环境下, 瓦氏黄颡鱼(*Pelteobagrus vachelli*)肌肉风味物质含量更丰富, 肉质更鲜美^[3]; 稻田养殖建鲤(*Cyprinus carpio* var.

Jian)、金边鲤(*Cyprinus carpio* var. *Jinbian*)肌肉蛋白质含量高于池塘养殖, 且肌肉弹性、咀嚼性与口感更佳^[4]; 稻田禾花鲤(*Procypris merus*)肌肉多不饱和脂肪酸(尤其是 EPA+DHA)含量较池塘养殖的更高^[5]; 稻田瓯江彩鲤(*Cyprinus carpio* var. *color*)肌肉必需氨基酸、矿物质元素等含量更丰富, 氨基酸与脂肪酸的组成也更加合理, 表明其具有更佳的营养品质^[6]。

养殖密度是影响鱼类生长的重要因子^[7], 过高的养殖密度可能导致水体富营养和水质恶化, 引起对养殖环境与鱼类生理功能不利的变化^[8]。高养殖密度也可导致养殖鱼类对于饲料及生存区

收稿日期: 2023-05-18; 修订日期: 2023-07-19.

基金项目: 国家大宗淡水鱼产业技术体系养殖新模式岗位项目(CARS-45).

作者简介: 丁崇航(1999-), 男, 硕士, 研究方向为水产健康养殖. E-mail: dingchonghang1999@163.com

通信作者: 朱健, 研究员, 研究方向为水产健康养殖与渔农综合种养, E-mail: zhuj@ffrc.cn; 李冰, 副研究员, 研究方向为渔农综合种养, E-mail: lib@ffrc.cn

域的争夺^[9], 降低生长性能、免疫功能^[10], 增加疾病暴发风险。因此, 优化养殖密度可保证养殖鱼类的正常生长, 有效提高鱼类产量、品质, 增加养殖系统效益并减少对环境的污染。

大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)是我国重要的淡水养殖肉食性鱼类, 2020 年其总产量约为 62 万 t^[11]。大口黑鲈养殖模式包括池塘、网箱、工厂化循环水等, 其中池塘养殖为最主要的养殖模式^[12]。不同养殖模式中, 大口黑鲈的适宜养殖密度存在较大的差异, 如在池塘养殖中为 4~6 kg/m³, 网箱养殖中为 1.5 kg/m³, 池塘工程化循环水养殖模式中为 0.2~0.4 kg/m³ (养殖 120 d), 室内循环水养殖模式中为 2.8 kg/m³ (养殖 56 d)。研究已表明, 在池塘、循环水养殖模式下养殖密度过高时会导致大口黑鲈生长及免疫性能降低, 引起氧化损伤, 提高养殖成本^[13-16]。前期的研究显示, 在稻渔综合种养系统中, 大口黑鲈养殖密度不宜超过 375 g/m³^[17], 然而在该系统中高养殖密度是否影响大口黑鲈肌肉组织抗氧化状态、营养组成和代谢功能尚未可知。本研究基于代谢组和转录组学分析, 结合抗氧化状态以及氨基酸和脂肪酸组成, 探究不同养殖密度下大口黑鲈肌肉代谢物、基因以及相关信号通路的变化, 在分子水平解析高密度养殖对大口黑鲈肌肉营养品质的影响, 并阐明其应对不利养殖环境的响应机制, 为优化稻-鲈共作养殖模式提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料与实验设计

本研究在江苏省靖江市中国水产科学研究院淡水渔业研究中心养殖基地进行。实验设计 6 个稻-鲈共作系统, 每个系统由种植区和养殖区(环沟)组成。种植区面积为 1624 m² (长 58 m, 宽 28 m), 养殖区面积 176 m² (宽 2 m, 深约 0.8 m), 稻田水深 10~20 cm。养殖系统示意图如图 1。系统中水稻种植品种为南粳 5055, 于 2021 年 6 月中旬插秧, 11 月上旬收割。水稻播种 40 d 后, 施肥并喷洒除草除虫农药 1 次; 60 d 后施穗肥一次。

实验开始于 7 月 30 日, 大口黑鲈购于安徽张林渔业有限公司(皖鲈 1 号新品系)。挑选规格相

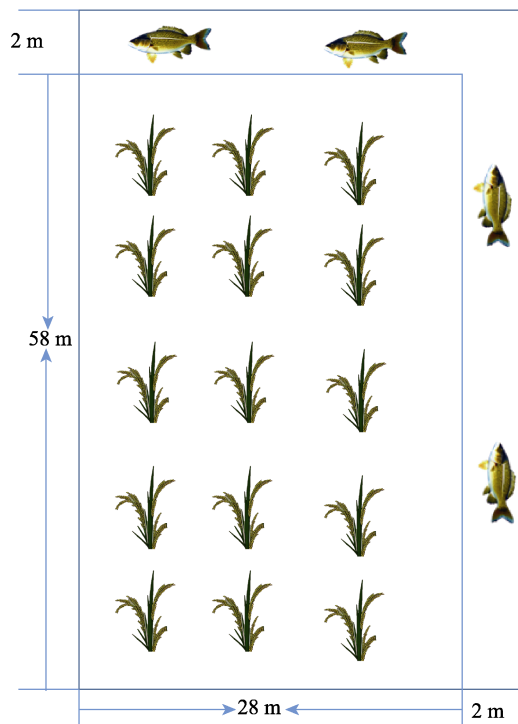


图 1 稻-鲈共作系统示意图

Fig. 1 Schematic diagram of rice-bass ecosystems

近, 健康无伤的大口黑鲈进行养殖实验, 大口黑鲈初始体重为(40.63±0.13) g, 体长(11.64±0.51) cm。设置初始养殖密度: 低密度组(L, 40 g/m³, 120 尾/系统)和高密度组(H, 120 g/m³, 360 尾/系统), 每个密度设 3 个重复。实验期间投喂大口黑鲈商品饲料(中国常州海大生物饲料有限公司, 粗蛋白≥47.0%、粗脂肪≥5.0%、粗灰分≥18.0%、粗纤维≥3.0%、赖氨酸≥2.7%), 每日投喂 2 次(8 时和 18 时各 1 次), 日投饲量为鱼体重 2%~3%, 并根据鱼体重调整。养殖期间保持稻田 20 cm 左右水位高度, 不定期进行补水, 水体 pH 和溶氧为(7.25±0.32)和(5.8±0.51) mg/L, 总氨氮低于 0.5 mg/L, 亚硝酸盐氮不超过 0.1 mg/L。养殖周期为 90 d, 实验于 10 月 30 日结束, 养殖期间不增氧、不施肥、不撒农药。养殖末期, 高密度组存活率(76.7%)低于低密度组(86.4%), 增重率(429.5%)显著低于低密度组(582.7%), 表明高养殖密度会抑制稻田养殖大口黑鲈生长^[17]。

养殖实验结束后, 每组随机挑选 36 尾鱼(每个重复 12 尾鱼), 使用 MS-222 (100 mg/L)进行麻醉后采集背部白肌组织, 测定抗氧化状态、氨基

酸和脂肪组成, 以及进行转录组和代谢组测序。抗氧化状态分析中, 4 条鱼肌肉组织混合成一个样本, 氨基酸和脂肪组成测定、转录组和代谢组测序中 12 条鱼肌肉组织混合为一个样本。

1.2 实验方法

1.2.1 抗氧化指标测定 取 0.1 g 肌肉组织, 加入 0.9 mL 生理盐水(0.86%), 制成 10%的肌肉匀浆。抗氧化指标主要包括总抗氧化能力(T-AOC)、超氧化物歧化酶(SOD)、还原型谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)。T-AOC、SOD 和 GSH 试剂盒购于南京建成生物工程研究所; MDA 和 CAT 购于上海碧云天生物技术有限公司; GSH-Px 选自苏州格锐思生物科技有限公司。所有指标按照试剂盒说明书进行测定。

1.2.2 氨基酸和脂肪酸组成测定 氨基酸含量检测采用酸水解法对肌肉样品处理, 取样品加 6 mol/L 盐酸于 110 °C 水解 22 h, 过滤定容水解液后取 1.0 mL 滤液减压干燥后过滤。游离氨基酸含量检测时, 取样品加 20 mmol/L 盐酸溶解定容, 活化前处理小柱后加样品 2.5 mL 及 20 mmol/L 的盐酸 1.5 mL, 过柱后用 20 mmol/L 盐酸定容后过滤。使用日本日立的 LA8080 氨基酸自动分析仪进行测定(GB5009.124-2016), 波长为 570 nm 和 440 nm, 进样体积 20 μ L, 色谱柱为磺胺型阳离子树脂分离柱, 反应温度 135 °C。脂肪酸含量使用 Agilent7890A 气相色谱仪检测(GB5009.168-2016), 样品经水解提取和甲酯化处理后进行检测。气相色谱仪主要参数: 色谱柱为 HP-88 (100 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.20 μ m); 升温程序为 100 °C 保持 13 min, 以 10 °C/min 速率升温至 180 °C 保持 6 min, 以 1.0 °C/min 速率升温 192 °C 保持 9 min, 以 3.0 °C/min 速率升温 230 °C 保持 2 min; 载气为 N₂, 流速 1.0 mL/min, 分流比 40 : 1。氨基酸、脂肪酸含量以鲜重计。

1.2.3 代谢组测序分析 精确称重 100 mg 样本加入 0.5 mL 的 80%甲醇水溶液, 于 4 °C、15000 r/min 离心 20 min, 取上清液稀释至甲醇含量为 53%后同等条件再次离心, 移取上清液进行 LC-MS 代谢

组测序。所有实验样本提取液等体积混合制备质控(quality control, QC)样本用于系统稳定性评价与提高数据质量。色谱条件: 色谱柱为 Hypesil Gold column (C18); 流速为 0.2 mL/min, 柱温为 40 °C; 代谢物采用梯度洗脱。质谱条件: 喷雾电压 3.5 kV, 鞘气流速 35 psi, 辅助气流速 10 L/min, 离子传输管温度 320 °C, 离子导入射频电平 60, 辅助气加热器温度 350 °C, 扫描范围 M/Z 为 100-1500。

将采集的数据导入 Compound Discoverer 3.1 中, 进行峰对齐、峰提取、面积定量、数据库(mzCloud, mzVault, Masslist)比对等处理, 得到代谢物定性定量结果。对于代谢物采用数据库(KEGG、HMDB、LIPIDMaps)进行注释。用 metaX 对数据进行偏最小二乘法判别分析(PLS-DA), 进而得到每个代谢物的 VIP 值。基于 *t* 检验计算各代谢物组间显著性(*P*-value)及差异倍数(fold change, FC)。差异代谢物筛选的默认标准为 VIP>1, *P*<0.05 且 FC $\geq$ 1.2 或 FC $\leq$ 0.83。使用 KEGG 数据库进行代谢通路富集相关分析。本部分实验及数据分析由北京诺禾致源科技股份有限公司协助完成。

1.2.4 转录组测序分析 使用 TRIzol 试剂提取肌肉中的总 RNA, 检验纯度、浓度与完整性, 使用 Oligo (dT)磁珠富集具 polyA 的真核 mRNA, 将其片段化后在 M-MuLV 逆转录酶体系中合成 cDNA 一链, 随后降解 RNA 链, 在 DNA polymerase I 体系下以 dNTPs 为原料合成 cDNA 二链。纯化双链修复处理后用 AMPure XP beads 筛选 cDNA 进行 PCR 扩增并再次纯化获得文库, 进行转录组测序。利用 fastp 过滤下机原始数据(raw data)获得有效数据(clean data), 利用 HISAT2 软件进行参考基因组序列比对, 用 Stringtie 软件重构转录本后找出新基因并统计基因类型。使用 RSEM 软件计算样本基因表达量, 以 FPKM 表示。使用 DESeq2 软件以差异倍数 $|\log_2FC| \geq 2$ 且 *P*<0.05 为标准筛选组间差异表达基因, 并将其与 GO 和 KEGG 数据库进行比对, 进行 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析。本部分实验及数据处理由广州基迪奥生物科技有限公司协助完成。

为了验证转录组测序分析结果的可靠性, 随机挑选了 6 个差异基因进行 qRT-PCR 验证。使用宝日医生物技术(北京)有限公司的 RNAiso Plus 试剂提取总 RNA, 以 primeScript™ RT 试剂盒

(TaKaRa, RR047A)合成 cDNA, 使用 qPCR 试剂盒 (TaKaRa, RR820A)检测相关基因的表达。以 β -actin 作为内参基因(表 1), 采用 $2^{-\Delta\Delta C_q}$ 法计算目标基因相对表达。

表 1 qRT-PCR 引物
Tab. 1 Primers used for qRT-PCR analysis

基因 gene	正向引物(5'-3') forward primer sequence (5'-3')	反向引物(5'-3') reverse primer sequence (5'-3')
<i>mylpf</i>	GCTGATCCCGAGGACGTTAT	CAAGGGGGAGTGAGTAGATGG
<i>alas2</i>	GGGAGAAATCCTACTTCGGCA	TATGAAAGTGACCGGTGTGC
<i>esrrb</i>	AAGGTGCCCATGCACAAACT	GGGTCTGCCTCTCCTGAGTA
<i>hba</i>	GCCACGGAAAGAAGGTCAT	ATGGTCAAGAGCGGCAGAC
<i>cebpb</i>	GCATGGAGTACCGACAGAGG	AGGTATGTCTCCAAAAGCTCAGT
<i>cry1</i>	GCCGACTTACCACGAGTTT	TCTGATGTGGATTCGGACGG
β -actin	AAAGGGAAATCGTGCCTGAC	AAGGAAGGCTGGAAGAGGG

1.3 统计分析

原始数据经 Excel 软件初步整理, 使用 SPSS 27.0 软件进行分析并将结果表示为平均值±标准误($\bar{x}\pm SE$)。通过独立样本 t 检验分析不同养殖密度之间的差异, $P<0.05$ 为差异显著, 具有统计学意义。通过 Pearson 检验对 RNA-seq 数据和 qPCR 数据进行相关性分析, $P<0.05$ 为差异显著。使用

Origin 2019 和 GraphPad Prism 8.0 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 抗氧化能力的变化

90 d 时, H 组肌肉 T-AOC 显著低于 L 组 ($P<0.05$), 但 SOD、CAT、GSH-Px 活性以及 MDA、GSH 含量在不同密度组中无显著差异(图 2)。

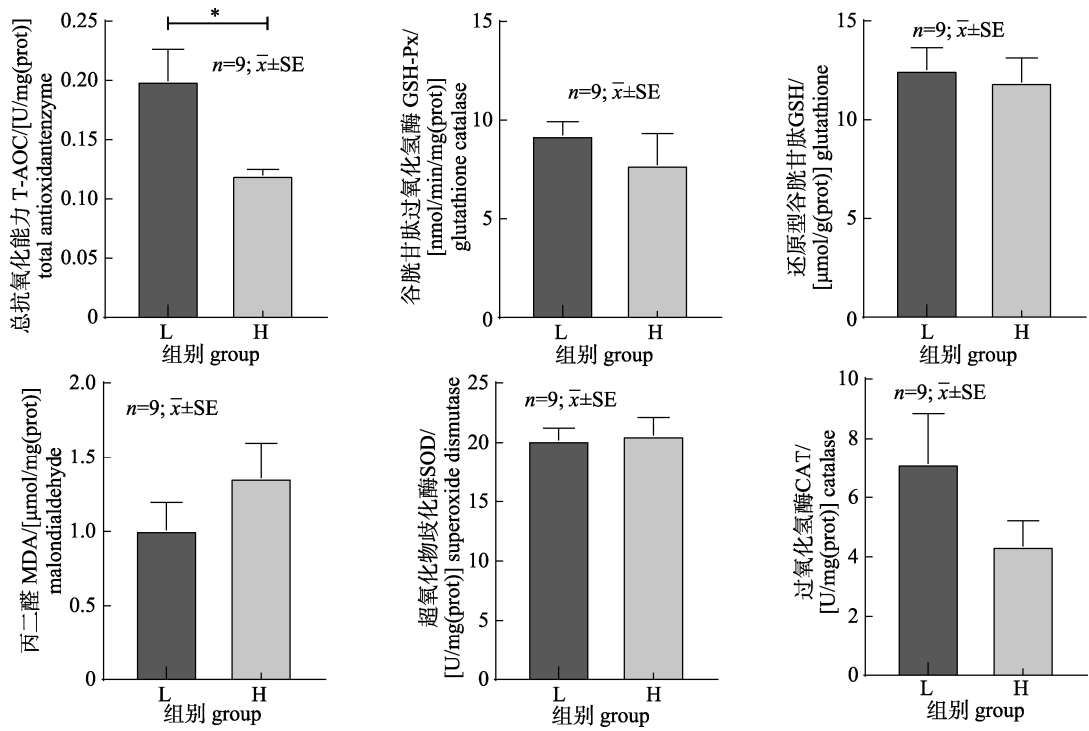


图 2 养殖密度对大口黑鲈肌肉抗氧化能力的影响

L: 低密度组(40 g/m³); H: 高密度组(120 g/m³); *表示组间差异显著($P<0.05$).

Fig. 2 Effect of stocking density on antioxidant capacity of *Micropterus salmoides* muscle

L: low density (40 g/m³); H: high density (120 g/m³); * indicates significant difference between different groups ($P<0.05$).

2.2 氨基酸和脂肪酸含量变化

大口黑鲈肌肉中共检测出 17 种水解氨基酸, 包括 7 种必需氨基酸(EAA)、2 种半必需氨基酸(HEAA)和 8 种非必需氨基酸(NEAA); 以及 13 种游离氨基酸, 包括 2 种鲜味氨基酸(UAA)、6 种甜味氨基酸(SAA)和 4 种苦味氨基酸(BAA)等。水解氨基酸中缬氨酸含量在 H 组显著下降($P<0.05$)。游离氨基酸中丙氨酸、组氨酸在 H 组含量显著下降($P<0.05$), 甘氨酸、天冬氨酸、谷氨酸含量与 Σ UAA 显著增加($P<0.05$)。两个密度组中 Σ SAA> Σ BAA> Σ UAA (表 2)。

表 3 结果显示, 大口黑鲈肌肉检测到 15 种水

解脂肪酸, 包括 3 种饱和脂肪酸(SFA)、5 种单不饱和脂肪酸(MUFA)以及 7 种多不饱和脂肪酸(PUFA), 且各组 Σ PUFA> Σ MUFA> Σ SFA。与 L 组相比, H 组肉豆蔻酸(C14:0)、棕榈酸(C16:0)、棕榈油酸(C16:1)、硬脂酸(C18:0)、油酸(C18:1n9c)、亚油酸(C18:2n6c)、 α -亚麻酸(C18:3n3)、花生烯酸(C20:1)和二十碳二烯酸(C20:2)含量以及 Σ SFA、 Σ MUFA、 Σ PUFA、 Σ n-6 PUFA 显著增加($P<0.05$), 而 n-3 PUFA/n-6 PUFA 比值降低。

2.3 肌肉代谢组学分析

结果显示, L 组和 H 组样本组间分离清晰, 表明两组存在差异性(图 3a), 同时经响应排序检验

表 2 不同养殖密度下大口黑鲈肌肉氨基酸含量及组成
Tab. 2 Content and composition of amino acids in muscle of *Micropterus salmoides* at different stocking densities

n=3; $\bar{x} \pm \text{SE}$; g/100 g					
水解氨基酸 hydrolyzed amino acid	低密度组 low density	高密度组 high density	游离氨基酸 free amino acid	低密度组 low density	高密度组 high density
谷氨酸 Glu	2.64±0.03	2.56±0.04	天冬氨酸 Asp [△]	0.01±0.002	0.03±0.006*
丙氨酸 Ala	1.04±0.01	1.06±0.01	谷氨酸 Glu [△]	0.16±0.003	0.19±0.003*
甘氨酸 Gly	0.84±0.01	0.91±0.02	甘氨酸 Gly ^{△△}	0.65±0.003	0.69±0.009*
天冬氨酸 Asp	1.80±0.01	1.75±0.03	丙氨酸 Ala ^{△△}	0.38±0.003	0.34±0.006*
蛋氨酸 Met [#]	0.32±0.06	0.23±0.08	丝氨酸 Ser ^{△△}	0.03±0.003	0.03±0.008
异亮氨酸 Ile [#]	0.81±0.01	0.77±0.02	脯氨酸 Pro ^{△△}	0.84±0.054	0.75±0.003
赖氨酸 Lys [#]	1.63±0.02	1.60±0.03	赖氨酸 Lys ^{△△}	0.32±0.060	0.22±0.068
亮氨酸 Leu [#]	1.49±0.04	1.38±0.03	苏氨酸 Thr ^{△△}	0.33±0.015	0.24±0.091
缬氨酸 Val [#]	0.94±0.01	0.88±0.02*	缬氨酸 Val ^{&}	0.05±0.005	0.06±0.009
苯丙氨酸 Phe [#]	0.80±0.02	0.76±0.01	胱氨酸 Cys	0.01	0.02±0.012
苏氨酸 Thr [#]	0.81±0.01	0.80±0.01	异亮氨酸 Ile ^{&}	0.02	0.02±0.002
丝氨酸 Ser	0.65	0.64±0.01	亮氨酸 Leu ^{&}	0.07±0.014	0.11±0.011
脯氨酸 Pro	0.59±0.02	0.64±0.01	组氨酸 His ^{&}	0.84±0.023	0.65±0.012*
胱氨酸 Cys	0.04±0.01	0.04±0.01	氨基酸总量 Σ TAA	3.70±0.164	3.33±0.116
酪氨酸 Tyr	0.51±0.04	0.43±0.02	鲜味氨基酸 Σ UAA	0.17±0.003	0.21±0.008*
精氨酸 Arg ^{##}	0.94±0.01	0.93±0.01	甜味氨基酸 Σ SAA	2.56±0.128	2.26±0.157
组氨酸 His ^{##}	0.46±0.02	0.45±0.01	苦味氨基酸 Σ BAA	0.97±0.041	0.84±0.028
氨基酸总量 Σ TAA	16.31±0.19	15.83±0.29			
必需氨基酸 Σ EAA	6.81±0.12	6.42±0.18			
半必需氨基酸 Σ HEAA	1.40±0.01	1.37±0.01			
非必需氨基酸 Σ NEAA	8.10±0.08	8.03±0.10			
EAA/TAA	41.75%	40.56%			
EAA/NEAA	84.07%	79.95%			
HEAA/TAA	8.58%	8.72%			
NEAA/TAA	49.66%	50.73%			

注: #必需氨基酸; ##半必需氨基酸; △鲜味氨基酸; △△甜味氨基酸; &苦味氨基酸; *表示组间差异显著($P<0.05$)。
Note: # indicates essential amino acid; ## indicates half essential amino acid; △ indicates umami amino acids; △△ indicates sweetness amino acid; & indicates bitterness amino acid; * indicates significant difference between different densities ($P<0.05$).

表 3 不同养殖密度下大口黑鲈肌肉脂肪酸含量及组成

Tab. 3 Content and composition of fatty acids in muscle of *Micropterus salmoides* at different stocking densities

$n=3$; $\bar{x} \pm \text{SE}$; g/kg

脂肪酸 fatty acid	低密度组 low density	高密度组 high density	脂肪酸 fatty acid	低密度组 low density	高密度组 high density
肉豆蔻酸 C14 : 0	0.23±0.055	0.50±0.039*	芥酸 C22 : 1n9	0.16±0.060	0.10±0.004
棕榈酸 C16 : 0	5.25±0.173	7.75±0.357*	EPA C20 : 5n3	0.08±0.011	0.14±0.019
棕榈油酸 C16 : 1	0.44±0.086	0.84±0.049*	二十四碳一烯酸 C24 : 1	0.12±0.030	0.09±0.004
硬脂酸 C18 : 0	1.67±0.129	2.03±0.061*	DHA C22 : 6n3	1.43±0.383	1.38±0.116
油酸 C18 : 1n9c	6.18±0.848	10.43±0.461*	Σ SFA	7.14±0.135	10.28±0.455*
亚油酸 C18 : 2n6c	6.54±0.473	10.18±0.618*	Σ MUFA	7.23±0.878	11.35±0.519*
α-亚麻酸 C18 : 3n3	0.36±0.050	0.65±0.056*	Σ PUFA	9.07±0.114	13.11±0.808*
花生烯酸 C20 : 1	0.32±0.035	0.49±0.015*	Σ EPA+DHA	1.51±0.393	1.51±0.134
二十碳二烯酸 C20 : 2	0.30±0.003	0.39±0.014*	Σ n-3 PUFA	1.86±0.343	2.17±0.178
花生三烯酸 C20 : 3n6	0.13±0.008	0.14±0.005	Σ n-6 PUFA	6.90±0.418	10.55±0.637*
花生四烯酸 C20 : 4n6	0.24±0.049	0.23±0.020	n-3 PUFA/n-6 PUFA	0.27	0.21

注: SFA 饱和脂肪酸; MUFA 单不饱和脂肪酸; PUFA 多不饱和脂肪酸; *表示组间差异显著 ($P<0.05$).

Note: SFA means saturated fatty acid; MUFA means monounsaturated fatty acid; PUFA means polyunsaturated fatty acid. * indicates significant difference between different densities ($P<0.05$).

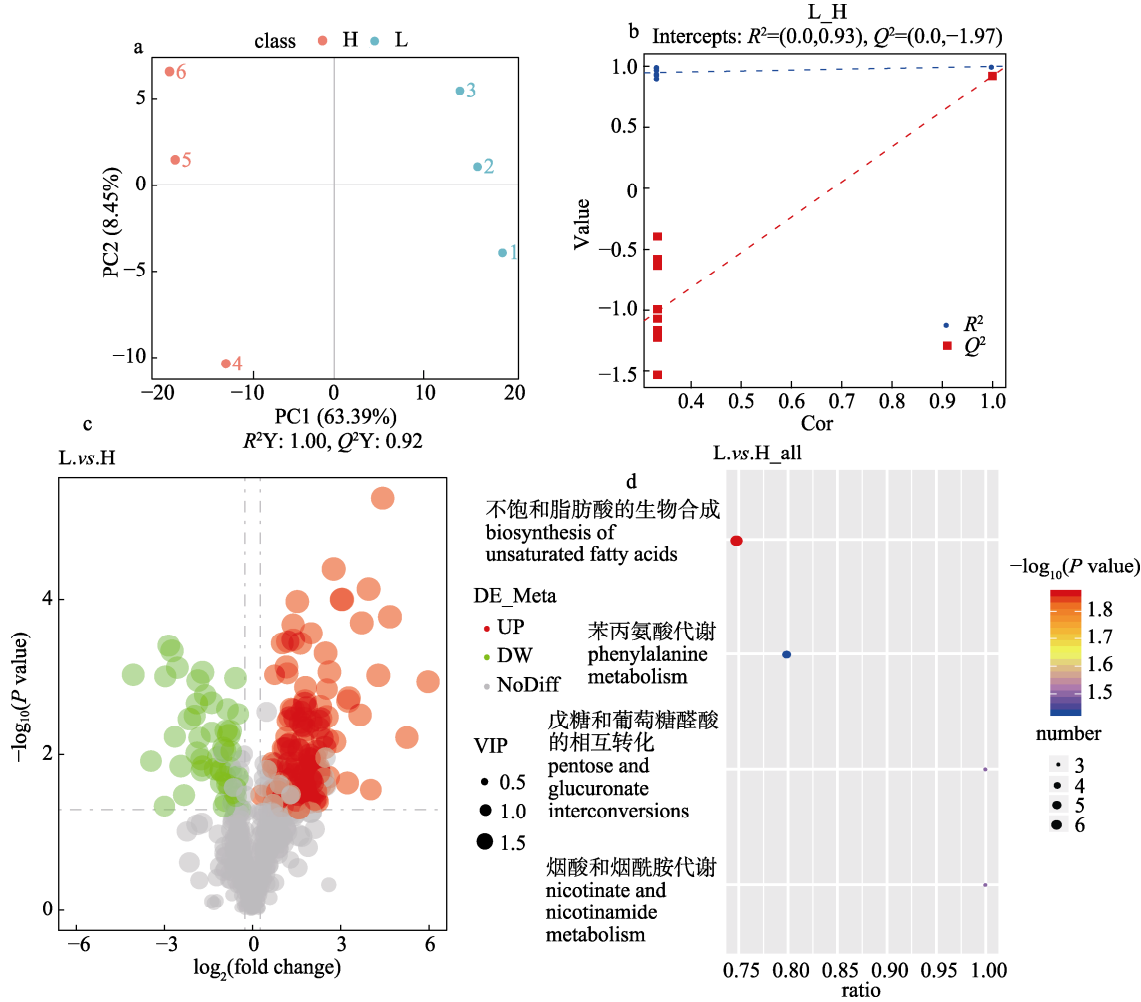


图 3 不同密度大口黑鲈肌肉差异代谢物

a. PLS-DA 得分图; b. 响应排序检验; c. 火山图; d. 代谢通路富集.

Fig. 3 Differential metabolites in the muscles of *Micropterus salmoides* at different densities

a. PLS-DA score plots; b. Response ranking test; c. Volcano plot; d. Enrichment metabolic pathways.

证明本批样本未出现“过拟合”(R²>Q² 且 Q² 回归线与 Y 轴截距<0, 图 3b), 表示此模型可用于后续分析。大口黑鲈肌肉样本中共检出 494 个代谢物, 高养殖密度引起 186 个差异代谢物, 其中 136 个上调, 50 个下调(图 3c)。

依照 HMDB 分类对鉴定到的代谢物进行注释, 不同养殖密度差异代谢物主要包括: 脂质及类脂分子 22 种, 核苷酸及衍生物 8 种, 有机酸及衍生物 24 种及其他代谢物 26 种。依照 Lipidmaps 数据库对检测出的脂质进行注释, 代谢物主要包括: 19 种甘油磷脂(glycerophospholipids, GP)、14 种脂肪酰(fatty Acyls, FA)、3 种固醇类(sterols, ST) 和 1 种甘油酯类(glycerolipids, GL)。

KEGG 分析显示 14 个差异代谢物显著富集于 4 条代谢通路, 分别为不饱和脂肪酸的生物合成(biosynthesis of unsaturated fatty acids)、苯丙氨酸代谢(phenylalanine metabolism)、烟酸和烟酰胺代谢(nicotinate and nicotinamide metabolism)以及戊糖和葡萄糖醛酸的相互转化(pentose and glucuro-

nate interconversions)(图 3d)。与 L 组相比, H 组不饱和脂肪酸生物合成途径中差异代谢物除亚油酸外均上调, 苯丙氨酸代谢途径中 4-羟基苯甲酸、延胡索酸上调, 苯丙酮酸和酪氨酸下调; 另外, 烟酰胺、二羟丙酮磷酸、D-5-磷酸核酮糖下调, α-酮戊二酸上调(表 4)。

2.4 肌肉转录组学分析

原始数据过滤后获得>99.3%有效数据, 两组碱基质量得分 Q₂₀ 均在 97.5%以上, Q₃₀ 均在 93.2%以上, 且两组数据 GC 比例均在正常范围内, 表明本次测序质量较高, 可用于后续分析(表 5)。尽管 PCA 结果显示, H 组和 L 组样本并没有显著的分开, 但不同密度组肌肉共有 688 个基因差异表达, 与 L 组相比, H 组引起 508 个基因表达量上调和 180 个基因表达量下调(图 4)。

GO 富集分析结果表明, 差异基因在分子功能(molecular function)、细胞组分(cellular component)和生物过程(biological process)中均有分布(图 5)。在生物过程中, 差异基因主要富集于单有

表 4 不同养殖密度下大口黑鲈肌肉差异代谢途径及代谢物
Tab. 4 Differentially expressed metabolic pathways and metabolites in muscle of *Micropterus salmoides* at different stocking densities

代谢物 metabolite	HMDB 分类 HMDB classification	低密度组 low density	高密度组 high density	P	组间比较 intergroup comparison	代谢途径 metabolic pathway
棕榈酸 palmitic acid	fatty acyls	49435338.55	183849662.9	0.00219	↑	不饱和脂肪酸 的生物合成 biosynthesis of unsaturated fatty acids
花生四烯酸 arachidonic acid	fatty acyls	193107895.9	506430604	0.00517	↑	
二十二碳四烯酸 adrenic acid	fatty acyls	1373461.945	8599354.545	0.00592	↑	
二十碳五烯酸 EPA	fatty acyls	7266361.755	26883399.75	0.00959	↑	
二十二碳六烯酸 DHA	fatty acyls	790731185.3	1789355944	0.01076	↑	
亚油酸 linoleic acid	fatty acyls	5929970.382	1989335.407	0.00880	↓	
4-羟基苯甲酸 4-hydroxybenzoic acid	benzene and substituted derivatives	2431389.061	3187719.406	0.04939	↑	苯丙氨酸代谢 phenylalanine metabolism
苯丙酮酸 phenylpyruvic acid	benzene and substituted derivatives	2756448.411	479646.3937	0.00326	↓	
酪氨酸 L-tyrosine	carboxylic acids and derivatives	512103770.4	218065874.4	0.01496	↓	
延胡索酸 fumaric acid	carboxylic acids and derivatives	24411290.37	50954262.41	0.02285	↑	
延胡索酸 fumaric acid	carboxylic acids and derivatives	24411290.37	50954262.41	0.02285	↑	烟酸和烟 酰胺代谢 nicotinate and nicotinamide metabolism
烟酰胺 nicotinamide	pyridines and derivatives	9832934173	6078406219	0.04981	↓	
二羟丙酮磷酸 dihydroxyacetone phosphate	organooxygen compounds	191246051.4	73398671.14	0.00033	↓	戊糖和葡萄糖 醛酸相互转化 pentose and glucuronate interconversions
二羟丙酮磷酸 dihydroxyacetone phosphate	organooxygen compounds	191246051.4	73398671.14	0.00033	↓	
D-5-磷酸核酮糖 D-ribulose 5-phosphate	organooxygen compounds	406712522.4	226329366.4	0.02944	↓	
α-酮戊二酸 alpha-ketoglutaric acid	keto acids and derivatives	4833410.231	9651355.977	0.00818	↑	

表 5 测序数据统计
Tab. 5 Statistics of sequencing data

样品 sample	原始数据 raw reads	有效数据 clean reads	Q ₂₀ /%	Q ₃₀ /%	GC 含量/% GC content	总比对 total mapped
H-1	39496716	39249262 (99.37%)	97.78	93.80	50.98	37942893 (96.71%)
H-2	37647548	37411344 (99.37%)	97.84	93.91	50.71	36178221 (96.75%)
H-3	36717006	36484360 (99.37%)	97.87	94.00	50.77	35287027 (96.79%)
L-1	36778486	36539218 (99.35%)	97.67	93.55	50.76	35268721 (96.59%)
L-2	39912550	39664004 (99.38%)	97.56	93.27	50.62	38237824 (96.45%)
L-3	47822302	47540264 (99.41%)	97.87	93.94	50.71	46094495 (97.00%)

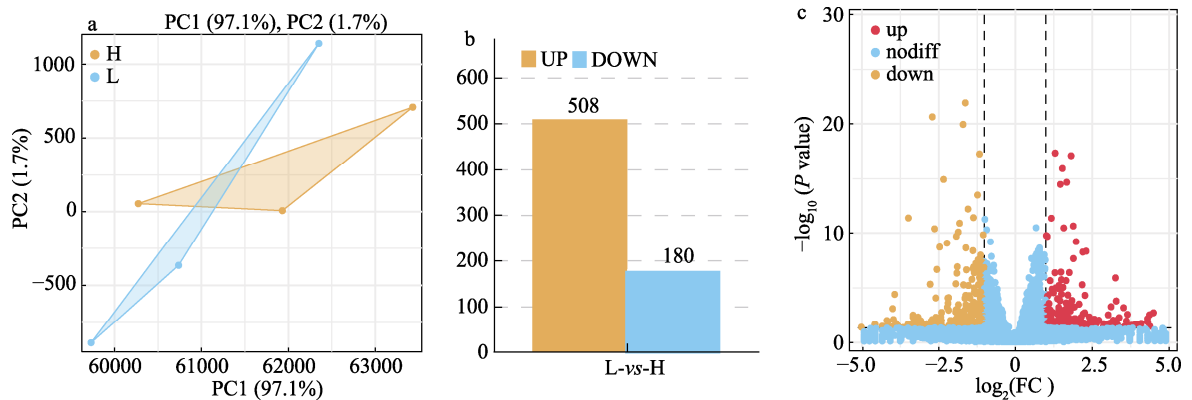


图 4 不同密度大口黑鲈肌肉差异表达基因

a. 样本相关性; b. 差异表达基因数量; c. 火山图.

Fig. 4 Differently expressed genes (DEGs) in the muscles of *Micropterus salmoides* at different densities
a. The correlation of samples; b. The number of differently expressed genes; c. Volcano plot.

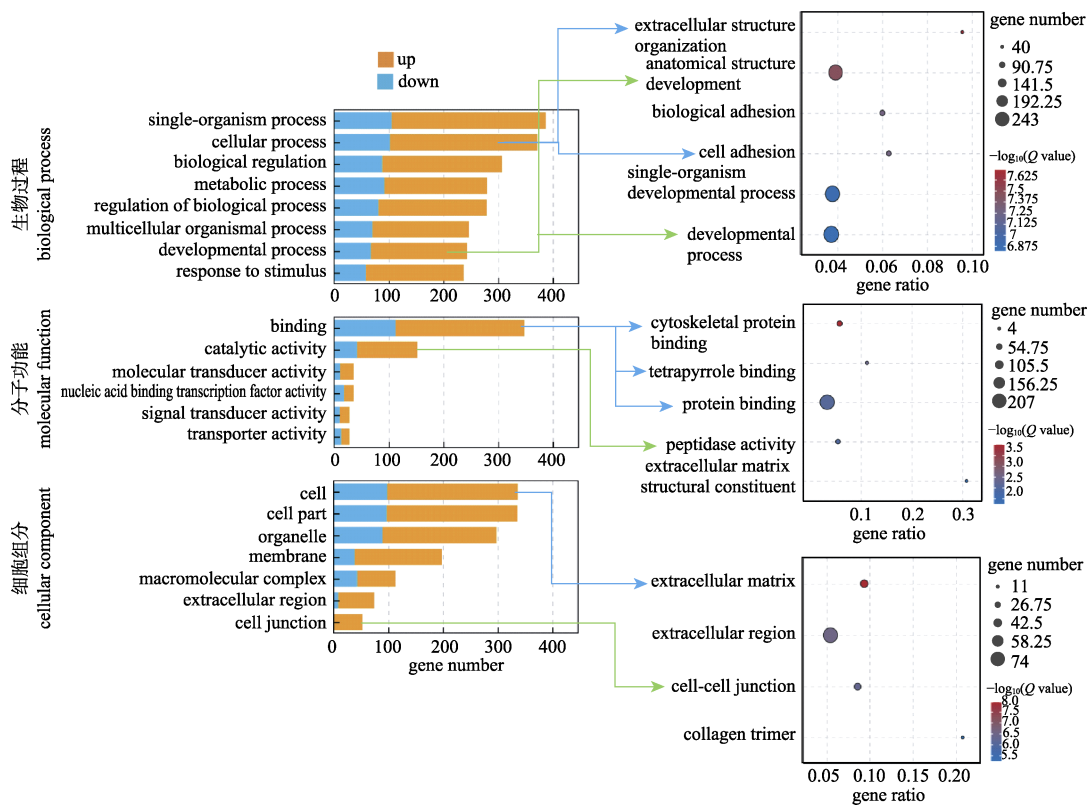


图 5 差异表达基因 GO 富集分析

Fig. 5 GO enrichment analysis for DEGs

机体过程(single-organism process)、细胞过程(cellular process)、代谢过程(metabolic process)以及发育过程(developmental process), 尤其富集于细胞外结构组织(extracellular structure organization)、解剖结构发育(anatomical structure development); 在分子功能中, 差异基因主要富集于结合(binding)与催化活性(catalytic activity), 尤其富集于蛋白质结合(protein binding)、肽酶结合(peptidase activity); 在细胞组成中, 差异基因主要富集于细胞及细胞部分(cell part)、细胞器及细胞器部分(organelle part)、膜与膜部分(membrane part), 尤其富集于胞外基质(extracellular matrix)、胞间连接(cell-cell junction)等。

KEGG 富集分析显示, 差异表达基因主要富集于生物体系统(organismal systems)、新陈代谢(metabolism)、环境信息过程(environmental information processing)等 5 个一级分类中(图 6a)。由图 6b 所示, 差异基因主要集中于 ECM-受体相互作用(ECM-receptor interaction)、黏着斑(focal adhesion)、紧密连接(tight junction)、PI3K-Akt 信号通路(PI3K-Akt signaling pathway)、蛋白质消化吸收(protein digestion and absorption)等信号通路; 同时高养殖密度还影响氮代谢(nitrogen metabolism)、嘧啶代谢(pyrimidine metabolism)、烟酸和烟酰胺代谢(nicotinate and nicotinamide metabolism)以及糖胺聚糖降解(glycosaminoglycan degradation)等信号通路。此外, 在 ECM-受体互作信号通路中, 高养殖密度引起 24 个基因显著上调, 2 个基因显著下调(图 6c); 在 PI3K-Akt 信号通路中, 高养殖密度引起 31 个基因显著上调, 7 个基因显著下调(图 6d)。

如图 7 所示, 所选 6 个差异基因的表达与转录组测序分析结果趋势一致, 进一步相关性分析表明二者具有显著相关性($r=0.863$, $P=0.027$), 表明转录组测序分析结果可靠。

3 讨论

3.1 养殖密度对大口黑鲈抗氧化状态的影响

自由基是由机体产生的具有较高氧化活性的物质, 参与维持机体多项生理活动, 主要为活性氧自由基。拥挤胁迫下鱼体可产生过量活性氧自

由基, 导致抗氧化系统损伤以及氧化还原平衡破坏^[8]。一般情况下过量自由基可被抗氧化酶体系清除^[18], 当鱼类遭受严重的应激时, 氧化还原平衡被打破, 抗氧化酶活性下降^[19], 进而引起细胞或组织损伤。高养殖密度条件下, 团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)幼鱼^[20]肌肉抗氧化系统异常; 红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)^[21]抗氧化能力降低且增强脂质过氧化; 西伯利亚杂交鲟 [*Acipenser baerii* (♀)×*Acipenser schrenckii* (♂)]^[22]抗氧化酶活性被抑制, 产生氧化损伤。除养殖鱼类外, 高密度胁迫也会显著影响中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)^[23]生长和抗氧化能力。本研究表明, 高养殖密度引起 T-AOC 的显著降低, 这与太湖鲂鲢 [*Culter alburnus* (♀)×*Megalobrama terminalis* (♂)]^[24]、红鳍东方鲀^[21]等的结果相似。此外本研究结果还显示, 在高密度中 CAT 活性降低, MDA 含量增加, 但差异不显著, 表明高养殖密度引起了适度的氧化应激, 其产生的影响可能在肌肉抗氧化酶系统耐受范围之内。

3.2 养殖密度对大口黑鲈肌肉品质的影响

鱼类肌肉必需氨基酸成分相对稳定均衡, 并具有鲜美的风味, 易消化吸收^[25]。养殖密度是影响养殖鱼类肌肉营养成分的重要因素之一, 不适宜的养殖密度会造成鱼类肌肉营养下降。已有研究表明, 慢性拥挤胁迫影响肌肉蛋白质含量^[26]; 高养殖密度导致团头鲂幼鱼肌肉脂肪含量及肌肉品质下降^[19]; 草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)^[27]在高密度养殖时, 肌肉氨基酸、脂肪酸含量升高而脂质含量降低。本研究结果表明, 稻田养殖大口黑鲈富含多种氨基酸, 各组 EAA/TAA 比例均在 40%~42%之间, EAA/NEAA 比例均>79%, 符合 WHO/FAO 提出的参考蛋白质模式标准(EAA/TAA≈40%, EAA/NEAA>60%)^[4]。H 组 EAA/TAA 低于 L 组, 且缬氨酸含量显著降低, 表明该密度下大口黑鲈肌肉氨基酸代谢受到抑制, 进而影响肌肉营养价值。

脂肪酸是影响肌肉品质的种养物质, 参与多种生理功能。SFA 优先被氧化供能, 而当机体能量需求高时, 油酸可被用作备用能源物质^[28], 但过度摄入肉豆蔻酸和棕榈酸会升高胆固醇和导致

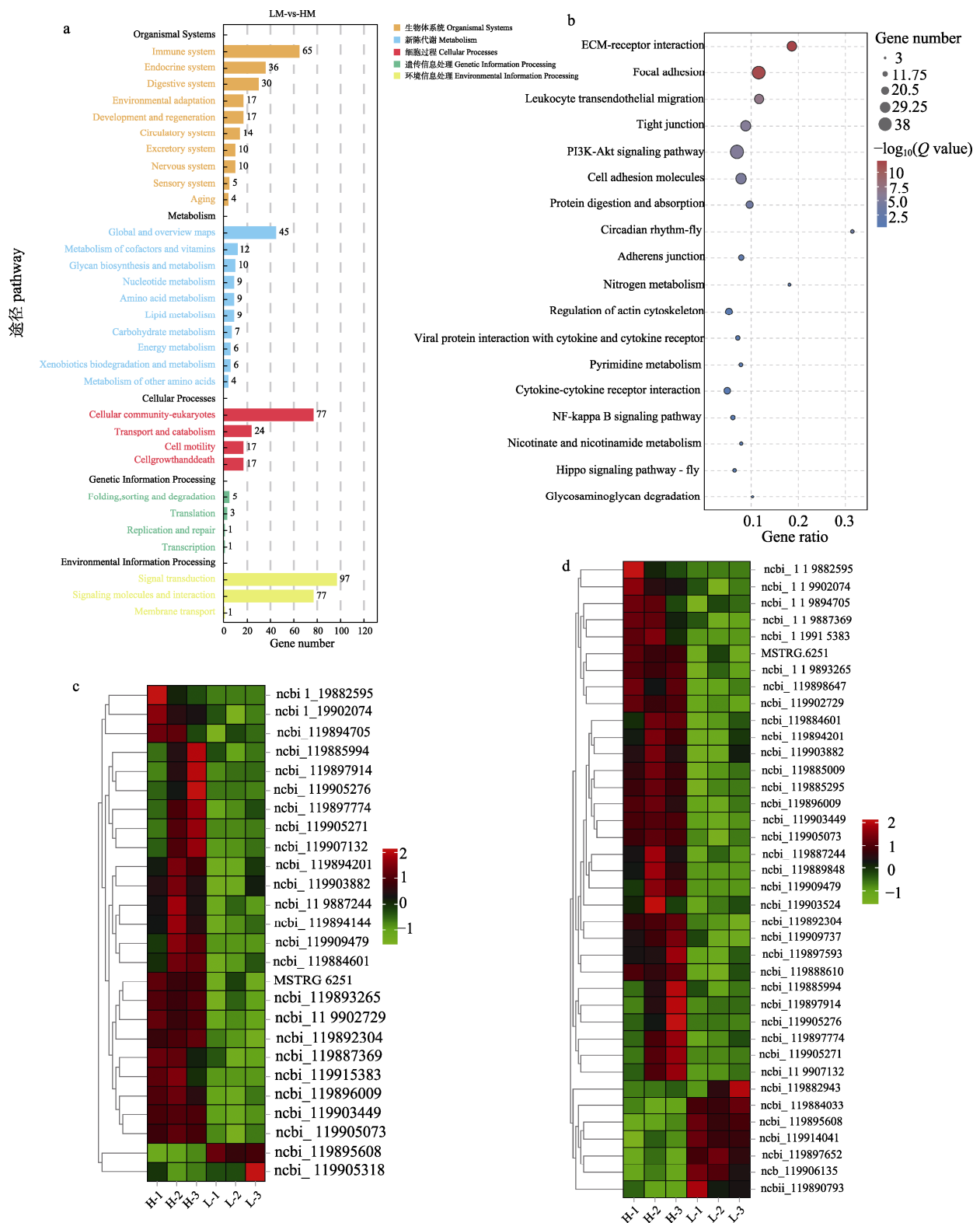


图 6 差异表达基因 KEGG 富集分析

a. KEGG 二级分类差异基因富集; b. KEGG 前 18 条富集途径;
c. ECM-受体互作差异基因富集; d. PI3K-Akt 信号通路差异基因富集。

Fig. 6 KEGG enrichment analysis for DEGs

a. DEGs enrichment in the secondary class; b. The top 18 enriched KEGG pathways;
c. DEGs enriched in the ECM-receptor interaction; d. DEGs enriched in the PI3K-Akt signaling pathway.

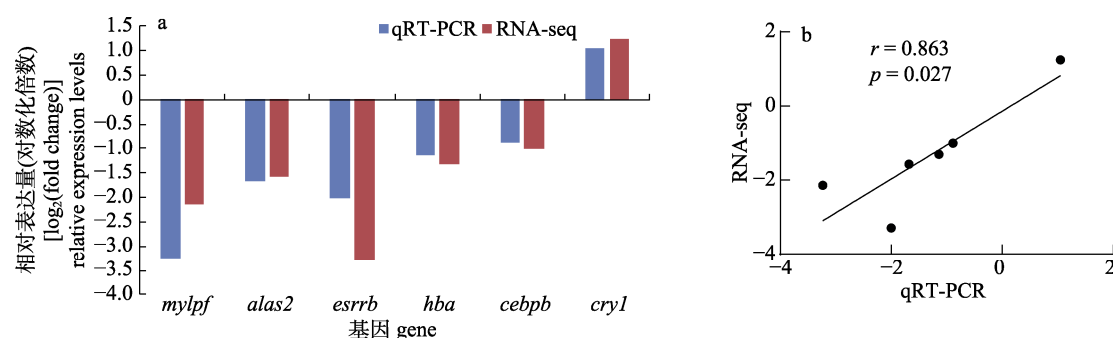


图 7 qRT-PCR 与转录组测序的基因表达验证

a. 差异基因表达量; b. qPCR 数据与 RNA-seq 数据之间的相关性分析.

Fig. 7 Gene expression verification by qRT-PCR and transcriptome sequencing

a. Differential gene expression; b. Correlation analysis between qPCR data and RNA-seq data.

高血脂^[29]。n-3 PUFA 可以改善心血管健康, 调节血糖血脂, 促进神经系统发育^[30]; n-6 PUFA 与 n-3 PUFA 存在代谢竞争, 当 n-3 PUFA 摄入不足时易造成 n-6 PUFA 衍生物增加。本研究结果表明, 稻田养殖大口黑鲈富含多不饱和脂肪酸, 具有较高的营养价值; H 组 Σ SFA、棕榈酸和油酸含量显著高于 L 组, 可能是由于高养殖密度下, 鱼类为了应对不利的胁迫而提高了脂肪的合成和存储以提供更多的能量物质。此外 H 组不饱和脂肪酸升高以及 n-3/n-6 PUFA 降低对黑鲈肌肉营养价值产生不利的影响。

水产品风味也是评判肌肉品质的指标之一, 其非挥发性成分受呈味氨基酸、核苷酸、糖类等物质及其相互反应的多重因素影响^[27]。游离氨基酸作为肌肉风味前体物质, 可以改善肌肉风味; PUFA 会对于肌肉风味产生重要的影响, 其氧化后会形成多种小分子挥发性化合物, 既有独特的香味又能相互作用产生新的风味, 肌肉中 n-3 PUFA 可以产生令人愉悦的风味, 而 n-6 PUFA 则会对肌肉香气产生负面影响^[31]。本研究中, 高养殖密度引起游离组氨酸含量显著下降, 游离甘氨酸和鲜味氨基酸显著增加, 可能由于密度胁迫增加了鱼体竞争, 从而增大运动, 提高鲜味氨基酸的含量^[32]。另外, 高密度下 PUFAs 含量与 n-6 PUFA 含量显著增加, n-3/n-6 PUFA 比例降低, 表明该条件对鱼肉风味可能产生不良影响, 具体作用机制有待进一步研究。

3.3 养殖密度对大口黑鲈代谢功能的影响

现有研究表明, 高养殖密度对于鱼类脂质、

蛋白质、糖类的生物合成与代谢具有负面影响^[33], 如高密度养殖大口黑鲈易发生脂质代谢紊乱现象, PPAR α 信号通路、脂肪细胞因子信号通路等途径下调^[17]。同时, 高密度养殖引起草鱼胆固醇合成及代谢、脂肪酸代谢、脂肪消化吸收等途径异常, 脂质及糖类代谢相关基因下调^[34]。对细鳞鲈 (*Brachymystax lenok*)^[35]的代谢机制研究表明, 高养殖密度会抑制脂质代谢, 改变氨基酸和胆碱代谢并引起鱼体代谢异常。本研究代谢组分析显示, 20 种氨基酸及类似代谢物在高密度组中相对含量降低, 表明高密度养殖可能会对多种蛋白质和氨基酸的代谢产生负面影响, 进而影响鱼类生理活动。此外, 高养殖密度引起 20-羧基白三烯 B4、反式油酸、棕榈酸等升高, 这些脂质代谢物升高可刺激机体产生炎症反应^[36-37]。KEGG 通路富集发现, 高密度养殖影响营养物质的合成代谢, 如促进不饱和脂肪酸生物合成、氨基酸代谢、糖类转化途径, 导致代谢紊乱。高密度组二羟丙酮磷酸的下调以及 α -酮戊二酸、延胡索酸的上调, 表明不利环境下大口黑鲈促进 TCA 循环以提供更多能量。烟酰胺参与多种生理活动, 可有效降低血液胆固醇、促进脂质合成、缓解氧化应激和炎症反应^[38]。高密度组烟酰胺含量下降, 表明机体脂质代谢与抗氧化状态受到负面影响。

养殖密度对鱼类代谢功能的影响体现在多个基因和通路调控中。前期研究表明, 过高的养殖密度会阻碍鱼类正常生长并引起肌肉应激和代谢异常, 如脂质合成或分解、代谢的受阻、氧化应

激等^[17]。本研究发现, 高养殖密度引起的 688 个差异表达基因, 主要与胞外结构与细胞黏附功能相关; 同时, KEGG 富集显示, 差异基因主要集中于 ECM-受体相互作用、紧密连接、PI3K-AKT 信号通路以及蛋白质消化吸收途径等。PI3K-AKT 信号通路为胞内信号转导途径, 易被外界因素激活从而调节细胞功能, 参与细胞生长代谢、增殖或抗凋亡等, 同时该通路也参与脂质合成转运与代谢调控^[39]。转录组学分析显示, PI3K-AKT 信号通路和 ECM-受体互作通路呈上调趋势, 表明细胞内外信号传导途径可能被激活, 促进代谢功能以及细胞生长增殖, 有益于机体适应不利的环境; 此外高养殖密度引起氧化应激, 激活 PI3K-AKT 信号通路, 促进细胞的生长和存活, 是一种机体应对不利环境的适应性响应机制。

4 结论

本研究首次联合应用生理生化指标、代谢组学和转录组学方法研究稻-鲈共作模式下高养殖密度对大口黑鲈肌肉抗氧化状态、肌肉营养风味、代谢功能的影响。高密度养殖引起适度氧化应激, 导致机体抗氧化能力降低。高密度组必需氨基酸比例、n-3/n-6 PUFA 下降, 饱和脂肪酸含量增加, 表明该条件下鱼体肌肉营养品质和风味受影响。代谢组学与转录组学分析结果表明高养殖密度下鱼体脂质、糖类物质和蛋白质的代谢功能都受到显著影响, 并可通过上调胞内及胞间的信号通路以适应不利的环境。本研究结果为稻渔综合种养系统中养殖鱼类响应环境胁迫的分子机制研究提供了新思路。

参考文献:

- [1] Guan W B, Liu K, Shi W, et al. Scientific paradigm of integrated farming of rice and fish[J]. Acta Ecologica Sinica, 2020, 40(16): 5451-5464. [管卫兵, 刘凯, 石伟, 等. 稻渔综合种养的范式[J]. 生态学报, 2020, 40(16): 5451-5464.]
- [2] Li J Y, Chang D, Li B N, et al. Benefit-cost analysis of different rice-based production systems[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(9): 1431-1438. [李嘉尧, 常东, 李柏年, 等. 不同稻田综合种养模式的成本效益分析[J]. 水产学报, 2014, 38(9): 1431-1438.]
- [3] Lü M, Gan H, Chen T C, et al. Comparison of growth performance and muscle quality of yellow catfish (*Pseudobagrus vachelli*) cultured in rice fields and ponds[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2022, 35(1): 75-81. [吕敏, 甘晖, 陈田聪, 等. 瓦氏黄颡鱼在稻田和池塘养殖中的生长性能和肌肉品质比较[J]. 水产学杂志, 2022, 35(1): 75-81.]
- [4] Ye X C, Zou H, Liu K, et al. Effects of pond and paddy field culture models on muscle quality of Jinbian carp and Jian carp (*Cyprinus carpio*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2020, 44(8): 1296-1305. [叶香尘, 邹辉, 刘康, 等. 池塘和稻田养殖模式对金边鲤和建鲤肌肉品质的影响[J]. 水产学报, 2020, 44(8): 1296-1305.]
- [5] Sun W B, Zhou M R, Hou M D, et al. Comparing the effects of pond and rice field culture methods on muscle quality of rice flower carp[J]. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(2): 196-204. [孙文波, 周明瑞, 侯梦丹, 等. 稻田和池塘养殖禾花鲤肌肉营养与品质分析[J]. 渔业科学进展, 2023, 44(2): 196-204.]
- [6] Li C, Yao J J, An M, et al. Analysis of biochemical composition in muscle of *Cyprinus carpio* var. *color* cultured in paddy field of Guizhou[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2010, 22(2): 505-510. [李川, 姚俊杰, 安苗, 等. 贵州稻田养殖甬江彩鲤肌肉生化成分分析[J]. 动物营养学报, 2010, 22(2): 505-510.]
- [7] Zhao D X, Cheng C, Xiao M, et al. Effects of stocking density on growth, antioxidant enzyme activity and related gene expression of juvenile Siberian hybrid sturgeon [*Acipenser baerii* (♀) × *A. schrenckii* (♂)] [J]. Journal of Fisheries of China, 2022, 46(9): 1582-1592. [赵大显, 程超, 肖敏, 等. 养殖密度对西伯利亚杂交鲟幼鱼生长、抗氧化酶活性和相关基因表达的影响[J]. 水产学报, 2022, 46(9): 1582-1592.]
- [8] Dai X L, Yang Z K, Zhu Q J. Effects of indoor aquaculture density and simple water quality control measures on water quality and culture efficiency of *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2018, 27(6): 894-906. [戴习林, 杨展昆, 朱其建. 凡纳滨对虾室内养殖密度和简易水质调控措施对水质及养殖效果的影响[J]. 上海海洋大学学报, 2018, 27(6): 894-906.]
- [9] Cao Y, Li E C, Chen L Q, et al. Effects of stocking density on growth, physiological and immune responses in juvenile Russian sturgeon[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2014, 38(5): 968-974. [曹阳, 李二超, 陈立侨, 等. 养殖密度对俄罗斯鲟幼鱼的生长、生理和免疫指标的影响[J]. 水生生物学报, 2014, 38(5): 968-974.]
- [10] Cheng J J, Li J F, Wen H S, et al. Effect of stocking density on growth, muscle composition and blood parameters of

- hybrid sturgeon juveniles[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2015, 22(3): 433-441. [程佳佳, 李吉方, 温海深, 等. 养殖密度对杂交鲟幼鱼生长、肌肉组分和血液生理生化指标的影响[J]. 中国水产科学, 2015, 22(3): 433-441.]
- [11] Wu J X, Liao R S, Kuang W M, et al. Effects of replacing fish meal with domestic poultry by-product meal on growth, liver health and intestinal barrier of *Micropterus salmoides* [J]. Journal of Fisheries of China, 2023, 47(10): 47-57. [吴佳瑄, 廖瑞生, 况文明, 等. 国产鸡肉粉替代鱼粉对大口黑鲈生长性能、肝脏健康及肠道屏障的影响[J]. 水产学报, 2023, 47(10): 47-57.]
- [12] Bai J, Li S. Development of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) culture[M]//Gui J F, Tang Q S, Li Z, et al. Aquaculture in China: Success Stories and Modern Trends. Wiley Blackwell, 2018: 421-429.
- [13] Zhang Q. Study on the effects of stocking density on growth, physiological indexes and muscle quality of *Micropterus salmoides*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2020. [张奇. 圈养模式下养殖密度对大口黑鲈生长、生理指标以及肌肉品质影响的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2020.]
- [14] Wei M W, He J G. Study on pollution-free and high-yield culture technology of California bass by cage[J]. Scientific Fish Farming, 2013(4): 34-35. [魏明伟, 何军功. 利用网箱开展加州鲈无公害高产养殖技术研究[J]. 科学养鱼, 2013(4): 34-35.]
- [15] Ni J J, Wang Y Y, Xu G C, et al. Effects of stocking density on the antioxidant status, tissue structure, and HSP70 and Cu/Zn-SOD expression in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) in an in-pond raceway culture system[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2020, 27(6): 660-670. [倪金山, 王裕玉, 徐钢春, 等. 养殖密度对池塘工程化循环水养殖大口黑鲈抗氧化力、组织结构及应激基因表达的影响[J]. 中国水产科学, 2020, 27(6): 660-670.]
- [16] Huang W Q, Huang L, Lai M J, et al. Effects of feeding frequency, water temperature and breeding density on growth performance, intestinal structure and hepatic growth-related gene expression hepatic of largemouth bass[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2022, 49(8): 111-119. [黄文庆, 黄龙, 赖明建, 等. 投喂频率、水温 and 养殖密度对大口黑鲈生长性能、肠道结构和肝脏生长相关基因表达量的影响[J]. 广东农业科学, 2022, 49(8): 111-119.]
- [17] Jia R, Wang L, Hou Y R, et al. Effects of stocking density on the growth performance, physiological parameters, redox status and lipid metabolism of *Micropterus salmoides* in integrated rice-fish farming systems[J]. Antioxidants, 2022, 11(7): 1215-1225.
- [18] Turchini G M, Moretti V M, Mentasti T, et al. Effects of dietary lipid source on fillet chemical composition, flavour volatile compounds and sensory characteristics in the freshwater fish tench (*Tinca tinca* L.)[J]. Food Chemistry, 2007, 102(4): 1144-1155.
- [19] Zhang C G, Ding W D, Cao Z M, et al. Effects of acute high temperature stress on antioxidant enzymes activity, digestive enzymes activity and gene expression of heat shock proteins in mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) [J]. Journal of Southern Agriculture, 2021, 52(3): 815-826. [张晨光, 丁炜东, 曹哲明, 等. 急性高温胁迫对翘嘴鲈幼鱼抗氧化酶和消化酶活性及热休克蛋白基因表达的影响[J]. 南方农业学报, 2021, 52(3): 815-826.]
- [20] Qi C L. Effect of stocking density and nitrite on physiological functions and muscle quality of blunt snout bream *Megalobrama amblycephala* juveniles[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2016. [齐成龙. 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[D]. 武汉: 华中农业大学, 2016.]
- [21] 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[J]. 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[J]. 渔业现代化, 2019, 46(4): 14-23.]
- [22] Wang Z Y, Cheng C, Zhu M J, et al. Transcriptome analysis of juvenile Siberian hybrid sturgeon at different stocking densities based on RNA-seq technique[J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2022, 44(2): 422-434. [王子予, 程超, 朱敏杰, 等. 不同养殖密度西伯利亚杂交鲟幼鱼转录组分析[J]. 江西农业大学学报, 2022, 44(2): 422-434.]
- [23] Zhang H E, He Y Y, Li J, et al. Effects of stocking density on growth, water quality, and antioxidant system of juvenile *Fenneropenaeus chinensis*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(2): 140-149. [张海恩, 何玉英, 李健, 等. 密度胁迫对中国对虾幼虾生长、抗氧化系统功能及水质指标的影响[J]. 渔业科学进展, 2020, 41(2): 140-149.]
- [24] Li Q, Sun L H, Jiang J H, et al. Stocking densities on growth, antioxidant enzyme activities and intestinal microbiota of hybrid of *Culter alburnus*(♀)×*Megalobrama terminalis*(♂) in ipra system[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2023, 47(3): 479-487. [李倩, 孙丽慧, 姜建湖, 等. 放养密度对 IPRA 养殖太湖鲢鲈生长、抗氧化酶及肠道微生物群落的影响[J]. 水生生物学报, 2023, 47(3): 479-487.]
- [25] Limin L, Feng X, Jing H. Amino acids composition difference and nutritive evaluation of the muscle of five species of

- marine fish, *Pseudosciaena crocea* (large yellow croaker), *Lateolabrax japonicus* (common sea perch), *Pagrosomus major* (red seabream), *Seriola dumerili* (Dumeril's amberjack) and *Hapalogenys nitens* (black grunt) from Xiamen Bay of China[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2006, 12(1): 53-59.
- [26] Zhang J M, Guo B F, Gao Y. Effects of chronic crowding stress on growth, feeding, and behavior in Chinese sturgeon *Acipenser sinensis* F2 juveniles[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(3): 592-598. [张建明, 郭柏福, 高勇. 中华鲟幼鱼对慢性拥挤胁迫的生长、摄食及行为反应[J]. *中国水产科学*, 2013, 20(3): 592-598.]
- [27] Zhao H H. The effects of stocking density and feeding models on muscle quality and metabolic regulations of grass carp *Ctenopharyngodon idellus*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2019. [赵鸿昊. 养殖密度和投喂模式对草鱼肌肉品质和代谢调控的影响[D]. 武汉: 华中农业大学, 2019.]
- [28] Izquierdo M S. Essential fatty acid requirements of cultured marine fish larvae[J]. *Aquaculture Nutrition*, 1996, 2(4): 183-191.
- [29] Dong L X, Yu Y L, Mao T, et al. Analysis of muscle quality variations of *Ictalurus punctatus* reared in internal-circulation pond aquaculture[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2021, 28(7): 914-924. [董立学, 喻亚丽, 毛涛, 等. 池塘内循环流水养殖斑点叉尾鲴肌肉品质的分析[J]. *中国水产科学*, 2021, 28(7): 914-924.]
- [30] Steffens W, Wirth M. Influence of nutrition on the lipid quality of pond fish: Common carp (*Cyprinus carpio*) and tench (*Tinca tinca*)[J]. *Aquaculture International*, 2007, 15(3): 313-319.
- [31] Xia X H, Li J, Cheng Y L, et al. The comparative study of the flavor of *Eriocheir sinensis* between pond cultivation and lake fence breeding[J]. *The Food Industry*, 2015, 36(9): 172-175. [夏秀华, 李晶, 成玉梁, 等. 池塘养殖和湖泊网围养殖河蟹风味品质比较研究[J]. *食品工业*, 2015, 36(9): 172-175.]
- [32] Song B L, Lin X T, Xu Z N. Effects of upstream exercise training on feeding efficiency, growth and nutritional components of juvenile tinfoil barbs (*Barbodes schwanenfeldii*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(1): 106-114. [宋波澜, 林小涛, 许忠能. 逆流运动训练对多鳞四须鲃摄食、生长和体营养成分的影响[J]. *水产学报*, 2012, 36(1): 106-114.]
- [33] Zhao H H, Soufan O, Xia J G, et al. Transcriptome and physiological analysis reveal alterations in muscle metabolisms and immune responses of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) cultured at different stocking densities[J]. *Aquaculture*, 2019, 503: 186-197.
- [34] He Y, Yu H Y, Zhao H G, et al. Transcriptomic analysis to elucidate the effects of high stocking density on grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *BMC Genomics*, 2021, 22(1): 620.
- [35] Liu Y, Liu H B, Wu W H, et al. Effects of stocking density on growth performance and metabolism of juvenile lenok (*Brachymystax lenok*)[J]. *Aquaculture*, 2019, 504: 107-113.
- [36] Zhao T T, Shen L Y, Pan X D. Research progress of leukotriene B4 receptor antagonists[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2022, 57(10): 3133-3145. [赵甜甜, 沈珑瑛, 潘显道. 白三烯 B4 受体拮抗剂的研究进展[J]. *药科学报*, 2022, 57(10): 3133-3145.]
- [37] Yao Z, Hu C X, Li X P. Effect of elaidic acid on morphology and function of endothelial cells[J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2017, 39(6): 574-578. [姚昭, 胡彩霞, 李小平. 反油酸对血管内皮细胞功能及形态的影响[J]. *营养学报*, 2017, 39(6): 574-578.]
- [38] Wei X S, Yao J H, Wang C. Similarities and differences of niacin and niacinamide in study on metabolism and production of ruminant[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2020, 32(12): 5509-5515. [魏筱诗, 姚军虎, 王翀. 烟酸和烟酰胺在反刍动物机体代谢及生产研究中的异同性[J]. *动物营养学报*, 2020, 32(12): 5509-5515.]
- [39] Huang J. Irisin attenuates myocardial injury in diabetic cardiomyopathy mice through PI3K/akt/mTOR signaling pathway[D]. Luzhou: Southwest Medical University, 2022. [黄静. 鸢尾素通过调控 PI3K/Akt/mTOR 信号通路改善糖尿病心肌病小鼠心肌损伤[D]. 泸州: 西南医科大学, 2022.]

Effects of stocking density on the antioxidant capacity, muscle nutrient composition and metabolism function of *Micropterus salmoides* in integrated rice-bass farming systems

DING Chonghang¹, JIA Rui², HOU Yiran², LI Bing², ZHU Jian^{1,2}

1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 200120, China;

2. Key Laboratory of Integrated Rice-Fish Farming Ecology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China

Abstract: The integrated rice-fish farming mode is an environment-friendly ecological cycle agricultural production mode, which effectively improves the utilization rate of land and water resources. Stocking density is an important factor affecting fish growth. Excessive stocking density has been found to cause eutrophication and deterioration of the water quality, leading to abnormal physiological functions in fish. It also leads to competition among cultured fish for feed and living space, which inhibits growth performance and immune function, and increases the risk of disease outbreaks. However, it remains unknown whether high stocking density affects the antioxidant status, nutritional composition, and metabolic function in the muscle of *Micropterus salmoides* during rice-fish integrated farming. Therefore, the aim of the study was to investigate the effects of stocking density on the antioxidant capacity, muscle nutritional composition and metabolic functions of *Micropterus salmoides* in integrated rice-bass farming systems. The largemouth bass with an initial body weight of 40.63 ± 0.13 g were reared at low density (L, 40 g/m³) and high density (H, 120 g/m³) for 90 days. After culturing, muscle tissue was collected to determine biochemical indexes and perform metabolome and transcriptome sequencing. The results showed that muscle total antioxidant capacity (T-AOC) in the H group was significantly lower than that in the L group. The catalase (CAT) activity decreased and malondialdehyde (MDA) content increased, but the differences were not significant, indicating that a high stocking density caused moderate oxidative stress, and its effects may be within the tolerance range of muscle antioxidant systems. The content of alanine and histidine free amino acids decreased significantly, whereas the content of glycine, aspartic acid, glutamic acid, and umami amino acids increased significantly. With respect to fatty acids, the content of Σ SFA, Σ MUFA, Σ PUFA, and n-6 PUFA increased significantly, whereas the ratio of n-3 PUFA to n-6 PUFA decreased. These results indicate that the nutritional quality of largemouth bass muscle decreased under high density, and the flavor was affected. Metabolomic results showed that 186 significantly different metabolites were detected between the L and H groups, including 136 up-regulated and 50 down-regulated metabolites. These metabolites were mainly related to the biosynthesis of unsaturated fatty acids, phenylalanine metabolism, nicotinate and nicotinamide metabolism, pentose and glucuronate interconversions, which indicated that high density stocking may cause metabolic disorders. Transcriptomic results showed that 688 significantly differentially expressed genes (DEGs) were detected between the L and H groups, including 508 up-regulated and 180 down-regulated genes, which were mainly enriched in cellular processes, metabolic processes, and protein digestion and absorption. Meanwhile, the key signaling pathways, including ECM-receptor interaction and PI3K-Akt, were up-regulated in the H group. In conclusion, high stocking density in integrated rice-bass farming systems affected antioxidant capacity, muscle nutrition and flavor and metabolic functions of lipids, carbohydrates, and proteins in *M. salmoides*. Additionally, *M. salmoides* could adapt to environmental stress by metabolic function regulation and intracellular signaling pathway activation. The results of this study provide a new premise for the molecular mechanism for the response of farmed fish to environmental stress in rice-fish integrated farming system.

Key words: integrated rice-fish farming; *Micropterus salmoides*; stocking density; nutrition composition; metabolomics; stress

Corresponding author: ZHU Jian, E-mail: zhuj@ffrc.cn; LI Bing, E-mail: lib@ffrc.cn