

文章编号:1000-0615(2010)07-1099-07

DOI:10.3724/SP.J.1231.2010.06888

高温胁迫对褐牙鲆生长及肝脏抗氧化酶活性的影响

徐冬冬^{1,2}, 楼宝^{1*}, 詹炜¹, 史会来¹, 毛国民¹, 骆季安¹, 程丽娜^{1,2}

(1. 浙江省海洋水产研究所,浙江省海水增养殖重点实验室,浙江舟山 316100;

2. 浙江海洋学院,浙江舟山 316004)

摘要:为了研究高温对褐牙鲆幼鱼生长及抗氧化酶活性的影响,对其不同温度处理(25、28、30、31、32℃)下的存活、生长、摄食及超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)的活力进行比较。结果显示25℃组、28℃组及30℃组的鱼没有死亡,31℃组的成活率为(95%±1.18%),32℃组的成活率仅为(20.83%±2.20%)。各温度处理组的特定生长率(SGR)、摄食率(FR)和饲料转化率(FCE)与水温的平方呈显著的负相关(SGR: $R^2=0.93$; FR: $R^2=0.90$; FCE: $R^2=0.86$; $P<0.01$),即25~32℃时,特定生长率、摄食率和饲料转化率随温度升高而减小。各处理组的肝脏组织中的SOD及CAT活力随胁迫温度升高而降低。本研究表明32℃是褐牙鲆长期生存的临界上限温度,高温能够显著影响其生长和抗氧化酶的活性。

关键词:褐牙鲆;高温胁迫;特定生长率;摄食率;超氧化物歧化酶;过氧化氢酶

中图分类号:Q 958.1; S 917

文献标识码:A

鱼类在长期的进化过程中,都有其适宜的环境温度,过低或过高的温度对鱼类的生长发育、摄食及免疫功能等具有显著影响。一般而言,温度升高能够促进鱼类的生长发育,但当温度超过一定限度时,会影响其生长,甚至会引发死亡^[1]。许多研究都表明鱼类的生长率、摄食率等与温度具有显著的相关性,如海鲈(*Dicentrarchus labrax*)^[2],夏牙鲆(*Paralichthys dentatus*)^[3],长吻𬶏(*Leiocassis longirostris*)^[4]等。另一方面,高温还会引发鱼体细胞中的胁迫反应,引起其体内氧化还原的压力。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和过氧化氢酶(catalase, CAT)是生物体内主要的抗氧化酶,在清除自由基和机体免受损伤方面发挥重要作用,从而维持细胞和机体正常的生理活动。生物体受到高温刺激后,会引起其体内的SOD及CAT等抗氧化酶的活性发生变化,如在金鱼、栉孔扇贝等水生生物中研究发现高温刺激显著影响了其体内SOD和CAT等酶的活性^[5-7]。因此,SOD和CAT是反映生物体在高温胁迫条件下生

理机能变化的有效指标^[8]。

褐牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)是我国重要的海水养殖品种之一,主要的养殖区域为辽宁、山东等北方省份。由于褐牙鲆经济价值高,养殖效益显著,在浙江、福建、广西等地也进行了繁育和养殖研究,但是,南方省份的沿海海域夏季水温较高,这可能是造成褐牙鲆成活率低的最重要的诱因之一^[9-10]。因此,开展高温对褐牙鲆生长性能及免疫功能的研究能够为其养殖提供必要的参考资料。目前,关于温度对褐牙鲆影响的相关研究已有很多报道,日本学者原田辉雄^[11]对褐牙鲆卵及仔稚鱼的生长发育过程与水温、盐度的关系进行探讨;随后,Seikai等^[12]研究了不同温度对褐牙鲆仔稚鱼生长和变态的影响,发现在一定温度范围内,温度升高能够加快褐牙鲆的生长发育;Fonds等^[13]研究了褐牙鲆早期生长与温度的相关性;国内学者朱鑫华等^[14]研究发现在水温7~27℃范围内,褐牙鲆的孵化时间及生长发育与温度呈负相关。现有的这些研究主要关注褐牙鲆的

收稿日期:2010-03-27 修回日期:2010-05-12

资助项目:国家“十一五”科技支撑计划(2007BAD43B05);浙江省重大科技专项(2008C12011,2009C12078,2009C12081)

通讯作者:楼宝,E-mail:louba06577@sohu.com

胚胎发育或仔稚鱼生长发育的最适温度,研究对象多为黄渤海及日本海域的褐牙鲆种群,关于高温对我国东海海域褐牙鲆幼鱼生长性能及免疫功能影响的研究尚未见报道。本研究以25℃为对照,采用不同的高温梯度对褐牙鲆进行胁迫,对其高温胁迫下的生长、存活、摄食及超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性进行系统的研究,探讨高温胁迫对褐牙鲆生长、存活及抗氧化酶活性的影响,以期为褐牙鲆的选择育种和健康养殖提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验养殖设施

实验在浙江省海水增养殖重点实验室(舟山,西闪岛)进行,使用 $1.5\text{ m}^2 \times 0.8\text{ m}$ 的圆形水缸养殖,海水采用盐度为28~30的砂滤海水,pH 7.5~8.2。实验周期中持续充气,使溶解氧浓度保持在5.0 mg/L以上。

1.2 实验材料

舟山水域采集野生褐牙鲆,经2a的人工驯化后作为亲鱼,进行苗种培育。实验鱼为2009年3月培育的同一批苗种,经3m的人工饲养,随机抽取600尾作为实验鱼。实验开始前,幼鱼在自然水温(20.5~23.5℃)中暂养两周。

1.3 实验设计

实验分为5个温度梯度,以25℃组为对照组,28℃组、30℃组、31℃组、32℃组为高温胁迫组,每个温度梯度设3个处理组,每个处理组为40尾鱼。采用电热棒(1000 W)对各水体进行加热,WMZK201型自动控温仪进行控温,控温精度为 $\pm 0.2\text{ }^\circ\text{C}$ 。实验开始前对各处理组以 $1\text{ }^\circ\text{C}/\text{d}$ 的速率逐步升温,待处理组的温度升至预设温度时,开始进行实验。实验周期为18 d,第19天水温恢复到25℃。实验期间采用预热水进行换水,上、下午各换水一次。

1.4 饲料投喂

所用饵料为人工配合颗粒饵料(林兼产业株式会社,鱼宝3号饲料),上午(9:30)、下午(15:30)各投喂一次,每次投喂结束40 min后开始收集残饵;由于残饵被海水浸泡后有较大幅度的增重,故残饵重是其残饵湿重经饵料含水量校正后的结果,根据投饵量和校正后的残饵量计算每天的摄食量。

1.5 生长性状测量

测量褐牙鲆初始和实验终末的全长和体重。

1.6 样品采集及SOD和CAT活力测定

分别在实验终末及温度恢复4 d后进行取样。取样时,每个处理组取3尾鱼,测量每条鱼的体重、全长和体高,然后解剖取肝脏,制备组织匀浆溶液,制备方法参照周进等^[15]的方法进行。SOD和CAT的活性测定采用南京建成生物研究所生产的试剂盒,蛋白含量采用考马斯亮兰法测定,吸光度值采用722型可见分光光度计测定。1个SOD(或CAT)活力单位(U)定义为1 mg组织蛋白在1 mL反应液中SOD抑制率达50%时所对应的SOD量(或CAT量)。

1.7 数据处理

体重增长率(WG)、全长增长率(LG)、特定生长率(SGR)、摄食率(FR)和饲料转化率(FCE)计算参照以下公式^[2~4]:体重增长率(WG, %) = $(W_t - W_0)/W_0$,全长增长率(LG, %) = $(L_t - L_0)/L_0$,特定生长率(SGR, % BW/d) = $(\ln W_t - \ln W_0) \times 100/t$;摄食率(FR, % BW/d) = $I_d/(t \times (W_t + W_0)/2)$;饲料转化率(FCE, %) = $100 \times (W_2 - W_1)/I_d$;其中, W_0 和 L_0 分别为初始体重(g)和全长(cm), W_t 和 L_t 分别为终末体重(g), t 为实验天数(d), I_d 为摄食量(g)。

实验数据采用平均值±标准差表示。所有数据经SPSS 11.5软件处理,采用One-Way ANOVA进行数据分析,不同处理组间采用Turkey方法进行多重比较。

2 结果

2.1 不同温度梯度下褐牙鲆的成活率

实验期间,25℃、28℃和30℃组的褐牙鲆幼鱼没有死亡,成活率为100%;31℃组有少量鱼死亡,第19天的成活率为($94.17\% \pm 5.20\%$)。32℃组的褐牙鲆在实验开始后第2天出现死亡,随高温胁迫时间延长,其死亡数量不断上升,第19天的成活率仅为($20.83\% \pm 6.29\%$)(图1)。随后,各组的高温胁迫停止,水温恢复到25℃,各处理组的鱼没有死亡。

2.2 不同温度梯度下褐牙鲆生长情况

实验初始,各组的全长和体重没有显著差别($P > 0.05$)。实验终末,25℃组、28℃组、30℃组、31℃组、32℃组的平均全长和体重分别为(19.26 ± 1.39)cm和(83.17 ± 18.33)g, (18.58 ± 1.51)cm

CAT活力变化如图3。25℃组的SOD和CAT活力最高,显著高于其他各组($P < 0.05$),其次是28℃组;30℃组、31℃组、32℃组的SOD和CAT活力没有显著差异($P > 0.05$)。水温恢复到25℃4d后,各高温胁迫组的SOD活力升高到对照组水平($P > 0.05$)。水温恢复后各组的CAT活力也有所上升,但与对照组相比,其CAT活力仍显著低于对照组($P < 0.05$)。这表明高温胁迫条件下,肝脏中SOD和CAT活力随胁迫温度梯度升高而下降,胁迫停止一段时间后,SOD和CAT的活力逐渐恢复,但CAT活力的恢复速度较SOD慢。

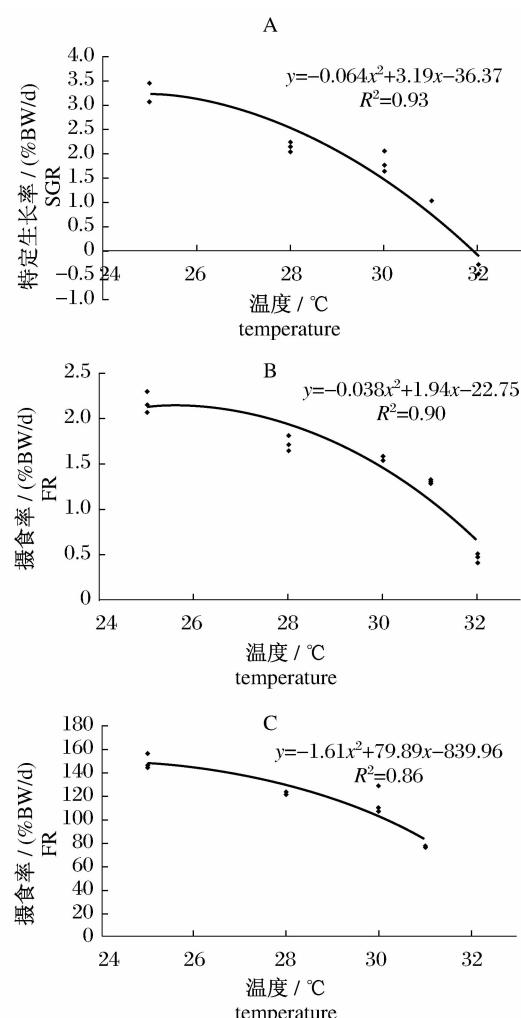


图2 褐牙鲆特定生长率、摄食率和饲料转化率与水温的关系

Fig. 2 Relationship between the specific growth rate, feeding rate, feed conversion efficiency and water temperatures in olive flounder

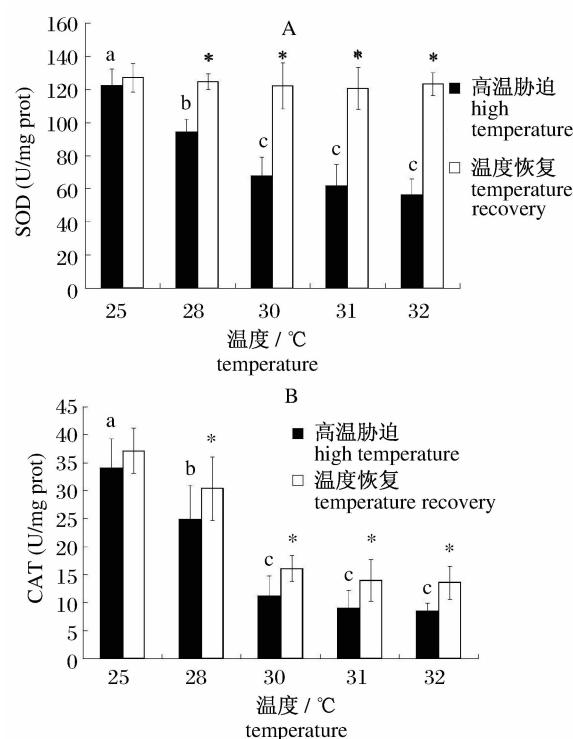


图3 高温胁迫和温度恢复后牙鲆肝脏

SOD(A) 和 CAT(B) 活力

不同字母表示不同处理组间差异显著($P < 0.05$),*表示同一组在高温胁迫和温度恢复后具有显著差异($P < 0.05$)。

Fig. 3 Effects of high temperature stress on SOD(A) and CAT(B) activity in liver tissue of olive flounder

Different letters indicate significant difference among treatments, * indicates significant difference between high temperature and temperature recovery in the same treatments.

3 讨论

3.1 温度对褐牙鲆生长及存活的影响

温度对鱼类生长的影响具有两面性,一方面温度升高导致鱼体的能量代谢加快,消耗的能量增加;另一方面,温度升高可以促进鱼体摄入能量转化为自身的净能量。在适宜生长范围之内,鱼类的生长率会随温度的升高而加快;当温度达到甚至超过鱼类的生存上限温度,生长率则下降^[16]。研究表明,许多鱼种的生长率与水温的平方呈显著的相关性,如长吻鮠^[4], bull trout (*Salvelinus confluentus*)^[17]等。褐牙鲆主要分布在黄渤海及日本海域,适应较低的水温,研究表明其适温范围为15~25℃^[11~13,18]。Iwata等^[19]研究发现褐牙鲆的特定生长率、摄食率和饲料转化率均随温度(20~30℃)的升高呈先增大后降低的趋势。Fonds等^[13]研究发现褐牙鲆(全长3.0~3.5 mm)的特定

生长率与水温的四次方呈显著的负相关,25 ℃时特定生长率最大,温度超过25 ℃,其生长率下降。本研究中,25~32 ℃范围内褐牙鲆的特定生长率与水温的平方呈显著的负相关,随着温度的升高其生长率下降,温度达到32 ℃时褐牙鲆生长率出现负增长,这一结果与Fonds等^[13]和Iwata等^[19]的研究是一致的。

本研究中还发现当温度达到31 ℃时,褐牙鲆出现部分死亡;温度达到32 ℃,褐牙鲆的死亡率急剧上升,这表明32 ℃可能是其长期生存的上限温度,这一结果与Fonds等^[13]的推测一致,他们也认为32 ℃可能是褐牙鲆热忍耐的上限温度。在极限温度下,鱼体的死亡与水温和置于此水温下的时间有关。高温导致鱼体的代谢紊乱,可能是引发鱼体死亡的原因^[16],目前,关于温度引起鱼体死亡的机制还需要进一步探讨。

3.2 高温胁迫对褐牙鲆抗氧化酶活性的影响

SOD和CAT是生物体内重要的抗氧化酶,SOD将代谢或外界刺激产生的有毒物质氧自由基分解成过氧化氢,再由CAT将过氧化氢还原成氧分子和水,从而维持细胞和机体的正常生理活动。本研究中,对照组的SOD和CAT的活性显著高于其他温度组,这可能与高温胁迫造成褐牙鲆体内的氧化还原压力增大有关。Lushchak等^[5~6]对金鱼进行高温胁迫,结果发现短期的高温刺激可以促进SOD和CAT的表达,从而使SOD和CAT等免疫保护酶活力升高,但高温刺激超过4 h其组织中的SOD和CAT等抗氧化酶的活力显著降低。Wang等^[20]比较不同温度下养殖的日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)发现当温度在27~32 ℃时其SOD活性随温度升高而下降。在栉孔扇贝中研究发现高温胁迫1 h后其血细胞中的SOD活性显著升高,但胁迫超过24 h,SOD活性下降^[7]。对欧洲猿头蛤(*Chamidae gallina*)的研究也发现其体内SOD的活性依赖于温度的变化,随着温度的升高,血细胞溶解液中的SOD活性会持续降低^[21]。以上这些研究表明,高温胁迫会使生物体内的活性氧产物升高,但随着胁迫时间的持续,生物体内的氧自由基不断积累,抗氧化酶的活力不足以抑制细胞内的氧化损伤,从而使体内的抗氧化酶活性降低^[22]。本研究中当温度胁迫停止一段时间后,SOD和CAT的活性恢复,这可能是由于体内的氧化还原压力降

低,从而可以使其肝脏内的SOD和CAT活性恢复,但SOD的恢复速度较CAT快,这可能是由于SOD是活性氧产物最初的也是最重要的解毒剂,对体内的氧化还原压力较CAT更为敏感^[23]。

参考文献:

- [1] 陈全震,曾江宁,高爱根,等.鱼类热忍耐温度研究进展[J].水产学报,2004,28(5):562~567.
- [2] Russell N R, Fish J D, Wootton R J. Feeding and growth of juvenile sea bass: the effect of ration and temperature on growth rate and efficiency [J]. Journal of Fish Biology, 1996(2), 49:206~220.
- [3] Malloy K, Targett T. Feeding, growth and survival of juvenile summer flounder *Paralichthys dentatus*: experimental analysis of the effects of temperature and salinity [J]. Marine Ecology Progress Series, 1991, 72(3):213~223.
- [4] Zhao H, Han D, Xie S, et al. Effect of water temperature on the growth performance and digestive enzyme activities of Chinese longsnout catfish (*Leiocassis longirostris* Günther) [J]. Aquaculture Research, 2009, 40(16):1864~1872.
- [5] Lushchak V I, Bagnyukova T V. Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 1. Indices of oxidative stress [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, 2006, 143(1):30~35.
- [6] Lushchak V I, Bagnyukova T V. Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 2. Antioxidant and associated enzymes [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, 2006, 143(1):36~41.
- [7] Chen M, Yang H, Delaporte M, et al. Immune condition of *Chlamys farreri* in response to acute temperature challenge [J]. Aquaculture, 2007, 271(1~4):479~487.
- [8] Martinez-Alvarez R M, Morales A E, Sanz A. Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors [J]. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 2005, 15(1~2):75~88.
- [9] 林越纠,吴石绅,何伟海,等.台湾海峡牙鲆养殖技术研究[J].海洋科学,2005,30(9):48~51.
- [10] 楼宝,毛国民,史会来,等.舟山野生牙鲆 *Paralichthys olivaceus*(Temminck et Sehlegel)的人工驯养试验[J].现代渔业信息,2008,23(6):15~17.
- [11] 原田辉雄.ヒラメの人工ふ化仔魚の飼育とその成長について[J].近大水研報告,1961,1:1~14.

- [12] Seikai T, Tanangonan J B, Tanaka M. Temperature influence on larval growth and metamorphosis of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in the laboratory [J]. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 1986, 52(6): 977–982.
- [13] Fonds M, Tanaka M, Van der Veer H W. Feeding and growth of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in relation to temperature and food supply [J]. Netherlands Journal of Sea Research, 1995, 34(1–3): 111–118.
- [14] 朱鑫华, 王云峰, 刘栋. 温度对褐牙鲆资源补充特征的生态效应 [J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(5): 477–485.
- [15] 周进, 宋晓玲, 黄健, 等. A3 α 肽聚糖对牙鲆不同组织中超氧化物歧化酶及磷酸酶活性的影响 [J]. 中国水产科学, 2004, 11(4): 296–301.
- [16] Weerd J H, Komen J. The effects of chronic stress on growth in fish: a critical appraisal [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, 1998, 120(1): 107–112.
- [17] Selong J H, McMahon T E. Effect of temperature on growth and survival of bull trout, with application of an improved method for determining thermal tolerance in fishes [J]. Transactions of the American Fisheries Society, 2001, 130(6): 1026–1037.
- [18] 王万连, 吴立新, 高杉, 等. 温度对牙鲆幼鱼消化率日变化和生长的影响 [J]. 大连水产学院学报, 2009, 24(Suppl.): 93–97.
- [19] Iwata N, Kikuchi K, Honda H, et al. Effects of temperature on the growth of Japanese flounder [J]. Fisheries Science, 1994, 60(5): 527–531.
- [20] Wang W, Wang A, Liu Y, et al. Effects of temperature on growth, adenosine phosphates, ATPase and cellular defense response of juvenile shrimp *Macrobrachium nipponense* [J]. Aquaculture, 2006, 256(1–4): 624–630.
- [21] Monari M, Matozzo V, Foschi J, et al. Effects of high temperature on functional responses of hemocytes in the clam *Chamelea gallina* [J]. Fish and Shellfish Immunology, 2006, 22(1): 98–114.
- [22] Downs C A, Fauth J E, Woodley C M. Assessing the health of grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) exposed to natural and anthropogenic stressors: a molecular biomarker system [J]. Marine Biotechnology, 2001, 3(2): 380–397.
- [23] Chen M, Yang H, Delaporte M, et al. Immune responses of the scallop *Chlamys farreri* after air exposure to different temperatures [J]. Journal of Experimental Marine Ecology, 2007, 345(1): 52–60.

Effect of high temperature stress on growth performance and activities of antioxidant enzymes in liver of olive flounder *Paralichthys olivaceus*

XU Dong-dong^{1,2}, LOU Bao^{1*}, ZHAN Wei¹, SHI Hui-lai¹,
MAO Guo-min¹, LUO Ji-an¹, CHENG Li-na^{1,2}

(1. *Marine Fishery Institute of Zhejiang Province, Zhejiang Province Key Lab of Mariculture and Enhancement, Zhoushan 316100, China;*
2. *Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316004, China*)

Abstract: To investigate the effect of high temperature stress on growth performance and activities of antioxidant enzymes in juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus*, the survival, growth, feeding, activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) of olive flounder at different temperatures (25 °C, 28 °C, 30 °C, 31 °C and 32 °C) were compared. The results showed that the survival rate of juvenile olive flounder was 100% at the temperatures of 25 °C, 28 °C, and 30 °C, and the survival rate was 95% ± 1.18% at the temperature of 31 °C. Nevertheless, the survival rate was (20.83% ± 2.20%) at the temperature of 32 °C. The water temperature significantly affected the specific growth rate (SGR), feeding rate (FR) as well as feed conversion efficiency (FCE) of juveniles. A quadratic regression was fit to describe the relationship between the SGR, FR, FCE and the water temperature (SGR: $R^2 = 0.93$; FR: $R^2 = 0.90$; FCE: $R^2 = 0.86$; $P < 0.01$). The SGR, FR and FCE reduced with increasing water temperature in the temperature range of 25–32 °C. Moreover, SOD and CAT activities in liver were measured under high temperature stress and the two critical antioxidant enzymes were also significantly affected by high water temperature. The activities of SOD and CAT declined with the increasing water temperature. This study indicated that the temperature of 32 °C may be the upper limit for olive flounder, and the high water temperature has a significant effect on growth performance and activities of antioxidant enzymes of olive flounder. Our results would be good references for genetic breeding and healthy culture of olive flounder.

Key words: *Paralichthys olivaceus*; high temperature stress; specific growth rate; feeding rate; superoxide dismutase; catalase

Corresponding author: LOU Bao. E-mail: loubao6577@sohu.com