

养殖密度对银鲳幼鱼生长、代谢酶活力及其相关基因表达的影响*

倪嘉豪¹, 朱晓静¹, 季益平¹, 周彬¹, 王亚军², 徐善良², 王丹丽¹

1. 宁波大学海洋学院, 浙江 宁波 315211;

2. 宁波大学应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315211

摘要: 采用为期 40d 的饲养试验, 探讨养殖密度(30 尾·m⁻³、60 尾·m⁻³ 和 90 尾·m⁻³)对初始平均体质量为(3.88±0.72)g 的银鲳幼鱼生长、肝脏和肾脏中谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)、乳酸脱氢酶(LDH)的酶活力以及相应基因 mRNA 表达的影响。结果显示: 1) 60 尾·m⁻³ 组银鲳幼鱼的增重率和特定生长率分别为(235.19±10.23)%和(4.03±0.10)%, 显著高于 30 尾·m⁻³ 组($p<0.05$), 而与 90 尾·m⁻³ 组无显著性差异($p>0.05$); 2) 90 尾·m⁻³ 组银鲳幼鱼的酶活力变化最显著, 30 尾·m⁻³ 组的变化幅度最小, 60 尾·m⁻³ 组介于两者之间; 3) 肝脏和肾脏中 LDH、ALT、AST 酶活力均呈先升高后降低的趋势, 其中肝脏中 LDH、ALT、AST 酶活力高峰分别出现在 6h、10d 和 10d, 是初始值的 2 倍、4.3 倍和 2 倍, 肾脏中 3 种酶活力峰值则分别出现在 1d、3d 和 5d, 是初始值的 2.1 倍、2.2 倍和 3.1 倍; 4) AST、ALT、LDH 等 3 种酶基因 mRNA 表达量变化规律与各自酶活力变化规律一致。综上所述, 养殖密度 60 尾·m⁻³ 时可促进银鲳幼鱼生长, 90 尾·m⁻³ 高密度养殖会导致银鲳幼鱼额外能量的需求增加, 糖异生相关基因 mRNA 表达量上调使肝脏、肾脏中 AST、ALT、LDH 酶活力显著升高, 最终出现生长变慢的情况。

关键词: 银鲳幼鱼; 养殖密度; 代谢酶; 谷草转氨酶、谷丙转氨酶、乳酸脱氢酶的基因表达

中图分类号: P735.541

文献标识码: A

文章编号: 1009-5470(2020)02-0054-11

Effects of breeding density on the growth, metabolic enzyme activity and related gene expression level of juvenile *Pampus argenteus**

NI Jiahao¹, ZHU Xiaojing¹, JI Yiping¹, ZHOU Bin¹, WANG Yajun², XU Shanliang², WANG Danli¹

1. School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China

Abstract: The feeding experiment lasted for 40 days to explore the effects of breeding density (30, 60 and 90 individuals·m⁻³) on the growth, enzyme activity and mRNA expression of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and lactate dehydrogenase (LDH) in liver and kidney of juvenile *Pampus argenteus* with an average body weight of (3.88±0.72) g. Results are as follows. The weight gain rate and specific growth rate of the 60 individuals·m⁻³ group were (235.19±10.23)% and (4.03±0.10)%, respectively, which were significantly higher than those in the 30 individuals·m⁻³ group ($p<0.05$), but showed no significant differences with the 90 individuals·m⁻³ group ($p>0.05$). The changes of enzyme activity of juvenile

收稿日期: 2019-05-07; 修订日期: 2019-07-25。殷波编辑

基金项目: 国家自然科学基金(31772869、31872586); 浙江省自然科学基金(LY15C190003、LY18C190008); 宁波市重大科技专项(2019C02059)

作者简介: 倪嘉豪(1996—), 男, 浙江省杭州市人, 研究方向为鱼类应激与免疫。E-mail: 834854149@qq.com

通信作者: 徐善良(1962—), 男, 教授。E-mail: xushanliang@nbu.edu.cn; 王丹丽(1962—), 女, 教授。E-mail: wangdanli@nbu.edu.cn

*感谢两位匿名审稿人提出宝贵的意见。

Received date: 2019-05-07; Revised date: 2019-07-25. Editor: YIN Bo

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (31772869, 31872586); Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LY15C190003, LY18C190008); Special Funds for Key Project of Science and Technology of Ningbo (2019C02059)

Corresponding author: XU Shanliang. Email: xushanliang@nbu.edu.cn; WANG Danli. E-mail: wangdanli@nbu.edu.cn

Pampus argenteus were the most significant in the 90 individuals·m⁻³ group and were the least significant in the 30 individuals·m⁻³ group. The activities of LDH, ALT and AST in liver and kidney increased first and then decreased, and the values of the three enzyme activities reached the peak at 6 h, 10 d and 10 d, respectively, which were 2.0 times, 4.3 times and 2.0 times of the initial values. The peak values of the three enzyme activities appeared at 1 d, 3 d and 5 d in kidney, respectively, and the values were 2.1 times, 2.2 times and 3.1 times of the initial values. The changes of mRNA expression of AST, ALT and LDH genes and the changes of the three enzyme activities in liver and kidney showed significant correlations. In conclusion, the breeding density of 60 individuals·m⁻³ could promote the growth of juvenile *Pampus argenteus*. However, the 90 individuals·m⁻³ group might cause extra energy demand increases in *Pampus argenteus* juveniles. Increased expression of gluconeogenesis-related genes mRNA resulted in significant increases of AST, ALT and LDH activities in liver and kidney, and eventually slowed down the growth of juvenile *Pampus argenteus*.

Key words: juvenile *Pampus argenteus*; breeding density; metabolic enzymes; AST, ALT and LDH gene expression levels

在水产养殖过程中, 养殖密度是影响养殖鱼类生长的主要因素之一, 而在现代集约化养殖中, 高养殖密度又是不可避免的。高密度养殖往往导致鱼类对氧气、生存空间以及饵料等竞争加剧, 从而改变鱼体内在的生理状况, 引起鱼对额外能量产生需求, 从而促使相关酶活力发生变化, 还会增大鱼病发生的可能性, 减缓养殖鱼的生长速度, 甚至导致大量死亡(Allen, 1974)。研究表明: 高密度条件下点带石斑鱼(*Epinephelus malabaricus*)初期血浆皮质醇显著提高, 肝脏中谷丙转氨酶、乙酰胆碱酯酶活力显著增加, 而后机体通过自身调节能力, 使皮质醇水平在一定程度上有所降低(遼尚尉 等, 2011); 高密度养殖下北极红点鲑(*Salvelinus alpinus*)出现食欲减退、耗氧量增加、行为应激等现象(Jørgensen et al, 1993); 高密度养殖的鲫鱼(*Carassius auratus*)皮质醇和溶菌酶均发生了变化(王文博 等, 2004); 长期的高密度养殖对中华鲟的生长、摄食和行为有显著的负面影响, 具体表现为运动频率、呼吸频率、游泳速度等显著提高(张建明 等, 2013)。

谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)活力与体内氨基酸的分解转化关系密切, 这两种酶活力水平的提高说明氨基酸被大量分解用以供能(Demeal et al, 1978)。乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)活力可以反映机体乳酸的分解速率。当动物对环境胁迫因子产生应激作用时, 神经内分泌系统分泌皮质醇激素并释放到血液中, 调控加强糖原异生途径, 氨基酸、乳酸等被消耗转变为葡萄糖和糖原, 以缓解应激时能量分流和代谢调节, 机体物质代谢从而发生变化(遼尚尉, 2010)。

银鲳(*Pampus argenteus*)隶属于鲈形目(Perciformes), 鲳亚目(Stromaeoidei), 鲳科(Stromateidae), 鲳属(*Pampus*), 是一种经济价值较

高的海水鱼类, 其野生资源量日渐减少。随着银鲳的人工育苗及养殖技术的突破, 在规模化养殖中同样面临着确定适宜养殖密度的问题。关于养殖密度对银鲳生长和生理影响的报道较少, 仅见银鲳低中密度(5~25 尾·m⁻³)的4个养殖密度的实验, 分析其相关酶活力指标的变化(彭士明 等, 2010)。然而, 目前实际生产中银鲳的养殖密度均高于25 尾·m⁻³。因此本实验探讨了30 尾·m⁻³、60 尾·m⁻³和90 尾·m⁻³3个养殖密度条件下, 测定分析银鲳幼鱼肝脏、肾脏组织内的AST、ALT和LDH活力的变化规律。同时, 利用实时荧光定量PCR技术, 比较3种养殖密度条件下幼鱼肝脏、肾脏中上述酶基因的mRNA表达水平差异, 以期从酶活水平和分子层面分析养殖密度对银鲳幼鱼生长和代谢的影响, 并将其作为优化银鲳幼鱼养殖密度的指标, 为大规模养殖银鲳提供理论参考。

1 材料和方法

1.1 实验用鱼

试验在宁波大学银鲳科研基地进行, 实验所用的银鲳幼鱼全部为人工培育, 养殖密度为20 尾·m⁻³。从同一池中选取健康活泼、同一批次培育的大小规格相近的个体810尾, 平均体质量(3.88±0.72)g, 平均体长(6.85±0.45)cm。

1.2 实验设计

采用有效水体1.5m³的PVC圆桶进行实验, 实验分成3个密度处理组, 分别为低密度组(30 尾·m⁻³)、中密度组(60 尾·m⁻³)、高密度组(90 尾·m⁻³), 每组3个平行。实验为期40d, 投喂自制的粘性团状饲料(日本产“鱼宝”牌饲料+新鲜鱼肉糜+海蜇的混合料), 每天投喂总体质量的3%~5%, 分4次投喂。试验期间连续充气, 每天换水100%, 海水盐度24‰~26‰, pH为7.9~8.1, 水温(28±1)℃, 溶解氧(DO)含量大于7mg·L⁻¹, 光照50~100lx。

1.3 样品采集

在试验开始后分别在 0h、6h、1d、2d、3d、4d、5d、10d、20d 和 40d 取样。每次每个处理组各取 6 尾(每个平行组取 2 尾), 取样后及时减少桶内水体积, 以保持相应的养殖密度。将取出的活鱼立即用 MS-222 麻醉, 分别称量体质量和体长并记录, 然后将幼鱼置于冰盘上快速解剖, 取部分肝脏、肾脏保存于 RNA 保存液中, 其余肝脏和肾脏组织置于-80℃ 冷冻保存。

1.4 方法

1.4.1 生长指标计算

增重率(WG, 单位: %)和特定生长率(SGR, 单位: %)计算公式如下:

$$WG=100 \times (m_t - m_0) / m_0 \quad (1)$$

$$SGR=100 \times (\ln m_t - \ln m_0) / t \quad (2)$$

式中: m_0 为实验开始时实验鱼的初始平均体质量(单位: g); m_t 为结束时实验鱼的初始平均体质量(单位: g); t 为实验天数(单位: d)。

1.4.2 酶液制备与酶活力测定

称取一定量的组织于离心管中, 放入冰盘中, 加 9 倍体积的生理盐水进行匀浆, 匀浆后于冷冻离心机中(2500r·min⁻¹, 4℃)离心 10min。取上清液, 用生理盐水稀释 10 倍, 此 1% 的待测液用于后续 AST、ALT、LDH 酶活力和组织蛋白浓度的测定。

组织中酶活力均采用试剂盒检测, AST 和 ALT 按赖氏比色法测定, 取 0.5mL AST 或 ALT 基质液, 加 0.1mL 组织匀浆稀释液, 混匀后 37℃ 水浴 30min, 后加入 0.5mL 2,4-二硝基苯肼液混匀, 37℃ 水浴 20min。最后加入 5mL 浓度为 0.4mol·L⁻¹ 的 NaOH 溶液混匀, 室温显色 5min, 用分光光度计在 505nm 波长下测得各孔 OD 值。查对标准曲线并通过计算公式得到相应的 AST 和 ALT 酶活力。组织中 LDH 酶活力采用微板法测定, 取 15μL 待测液加入 100μL 基质缓冲液和 20μL 的辅酶 I 应用液, 混匀后 37℃ 水浴中保温 15min, 后加入 100μL 2,4-二硝基苯肼液混匀, 37℃ 水浴 15min, 加入 1mL 浓度为 0.4mol·L⁻¹ 的 NaOH 溶液混匀, 室温显色 3min, 用分光光度计在 440nm 波长下测定各孔吸光值。通过 BCA 方法测定组织中的蛋白质浓度, 将 20μL 待测液加入样品孔, 再加入 200μL BCA 工作液, 37℃ 恒温箱保温 20~30min, 用分光光度计在 562nm 波长下测定各孔吸光值。实验中测定组织酶活力所用试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.4.3 目的基因的定量表达

取出储存在-80℃超低温条件下 RNA 保护液中的样品, 在冰上化冻, 并根据 TRIzol 试剂说明提取总 RNA, RNA 沉淀用 DEPC 水溶解, 用核酸定量仪(Thermo Scientific)测定 260nm 和 280nm 处的吸收值, 测定银鲳肝、肾组织样品中 RNA 的提出量和纯度, 而后用 1% 的琼脂糖凝胶通过 RNA 非变性电泳检测 RNA 完整度。取出等量(2μL)的 RNA, 根据 M-MLV (Promega)说明书进行肝脏和肾脏组织总 RNA 的反转录操作, 以合成 cDNA 第一链。

应用 Primer 5.0 软件设计特异扩增引物, AST-F、AST-R 参照斑马鱼(*Barchydanio rerio* var) (登录号: NM213379.1)、大黄鱼(*Larimichthys crocea*) (登录号: XM010741311.2)、斑点叉尾鮰(*Ictalurus Punetaus*) AST 基因(登录号: NM001200582.1); ALT-F、ALT-R 参照南极鳕鱼(*Dissostichus eleginoides*) (登录号: XM010776622.1)、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis* Gunther) (登录号: XM008307552.3)、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*) (登录号: XM003443496.4) ALT 基因; LDH-F、LDH-R 参照斑马鱼(登录号: BC067188.1)、南部黑鳕鱼(*Anoplopoma fimbria*) (登录号: AF079830.1)、黄鳍金枪鱼(*Thunnus albacores*) LDH 基因(登录号: AF079828.1), 具体引物如表 1 所示。以 cDNA 为模板, 参照 Premix Taq™ (TaKaRa Taq™ Version 2.0 plus dye)说明书进行目的基因片段 PCR 扩增。扩增产物回收纯化后送生工生物工程(上海)有限公司测序。

表 1 AST、ALT 和 LDH 基因荧光定量 PCR 所用引物
Tab. 1 Primer used for AST, ALT and LDH qRT-PCR

引物	序列(5'—3')	片段大小/bp	退火温度/℃
AST-F	AGTGGGAAGGAGATTGCTGACATTGT	242	58
AST-R	ACTCCACTCTCTTTGCCCTCATCTGT		
ALT-F	TCATCAAAGTGGTGTGCGGTGCG	103	61
ALT-R	TGTGGTGTAGGAGGGCTCATCAGGC		
LDH-F	GCGACAAAGACTACAGCGTGAC	137	57
LDH-R	CGATGTTGGGGATGATAAACTTGAA		

以 β -actin 基因为内参基因进行预实验, 样品 cDNA 用 RNase free ddH₂O 做 4 个 5 倍梯度稀释, 各设 3 个平行, 进行 RT-qPCR, 而后建立标准曲线, 确定最佳实验稀释倍数为 5 倍。对样品 cDNA 进行 5 倍梯度稀释, 以稀释后的 cDNA 为模板进行荧光定量 PCR, 每个样品设 3 个平行。PCR 反应体系(共

20μL); SYBR PremixEx Taq 10μL, 上、下游引物各 0.4μL, 模板 2μL, ddH₂O 7.2μL。反应条件: 95℃预变性 1min; 95℃变性 10s, 相应基因退火温度下退火 40s, 72℃延伸 40s, 共进行 40 个循环。结果采用 2^{-ΔΔCt} 法比较不同基因的表达量。

1.5 统计与分析

实验数据表示为平均值±标准误($\bar{x}\pm SE$), 采用 SPSS 13.0 软件统计, 用单因子方差分析进行差异显著性检验, Duncan 法多重比较检测各测量值指标的差异, $p<0.05$ 为差异显著。

表 2 养殖密度对银鲳幼鱼体生长的影响

Tab. 2 Effect of density on the growth of juvenile *Pampus argenteus*

组别	初始体质量/g	终末体质量/g	增重率/%	特定生长率/%
低密度组(30 尾·m ⁻³)	4.30±0.50	11.27±0.46	162.02±10.80 ^b	3.21±0.14 ^b
中密度组(60 尾·m ⁻³)	3.60±0.30	12.07±0.37	235.19±10.23 ^a	4.03±0.10 ^a
高密度组(90 尾·m ⁻³)	3.75±0.45	11.10±0.91	196.00±24.25 ^{ab}	3.61±0.27 ^{ab}

注: 不同小写字母表示该指标在不同密度组中差异显著($p<0.05$)

2.2 养殖密度对银鲳幼鱼肝脏中 3 种代谢酶活力的影响

2.2.1 谷草转氨酶

不同养殖密度下银鲳幼鱼肝脏中谷草转氨酶 (AST)随时间变化见图 1a。在 3 个密度组中, AST 活性表现为高密度组>中密度组>低密度组。高密度组 AST 活性显著高于中密度组和低密度组($p<0.05$); 中密度组 AST 在 6h、2d、3d 时间点活性与低密度组有显著差异($p<0.05$), 而在其他时间点无显著差异($p>0.05$)。从高密度组看, 随着胁迫时间的延长, AST 活性呈现先升高后降低的变化, 在 0h 后开始缓慢升高, 至 3d 后显著上升($p<0.05$), 10d 时达到最大值 222.44U·g⁻¹, 约为初始值的 4.25 倍, 而后又呈下降趋势($p<0.05$)。低密度和中密度组也有类似的变化, 但不显著, 中密度的 AST 活性变化范围为 21.72~52.30U·g⁻¹, 低密度组的 AST 活性变化范围为 17.82~52.30U·g⁻¹。

2.2.2 谷丙转氨酶

在不同养殖密度下, 银鲳幼鱼肝脏谷丙转氨酶 (ALT)活力变化见图 1b。实验初期的 6h~2d, 高密度组 ALT 酶活力显著高于中密度组和低密度组($p<0.05$)。3d 后至实验结束, 高密度组与中密度组无显著差异($p>0.05$), 但仍显著高于低密度组($p<0.05$)。高密度组和中密度组的 ALT 酶活力在 5d

2 结果

2.1 养殖密度对银鲳幼鱼生长的影响

3 个密度组银鲳幼鱼的增重率、特定生长率如表 2 所示。40d 的饲养试验结束后, 各组银鲳幼鱼的终末体质量差异不显著($p>0.05$)。中密度组(60 尾·m⁻³)银鲳幼鱼的增重率与特定生长率分别为(235.19±10.23)%、(4.03±0.10)%, 显著高于低密度组($p<0.05$); 高密度组(90 尾·m⁻³)幼鱼的增重率与特定生长率分别为(196.00±24.25)%、(3.61±0.27)%, 均略低于中密度组, 但无显著性差异($p>0.05$)。

后显著升高($p<0.05$), 10d 时达到活力最大值, 分别为 152.02U·g⁻¹和 159.51U·g⁻¹, 而后 20d 时显著下降跌入低谷, 约为 10d 值的 37%~38% ($p<0.05$), 40d 时又表现为显著上升, 但没有高于初始值。低密度组的幼鱼 ALT 酶活力高峰出现在 20d, 与高密度和中密度的低谷持平。

2.2.3 乳酸脱氢酶

各养殖密度下银鲳幼鱼肝脏乳酸脱氢酶(LDH)的活力变化见图 1c。除 1d、5d 外, 其他 7 个时间点高密度组 LDH 酶活力均显著高于中、低密度组($p<0.05$), 2d、3d、5d、10d 时中密度与低密度差异显著($p<0.05$)。高密度组 LDH 酶活力在 6h 骤然升高, 达到峰值 3428.61U·g⁻¹, 是初始值的 2 倍, 1d 时又显著下降($p<0.05$), 此后又在 4d 和 40d 出现两个峰值。中、低密度组的最大峰值均出现 40d, 分别为 2355.75U·g⁻¹和 2076.79U·g⁻¹。

2.3 养殖密度对银鲳幼鱼肾脏中 3 种代谢酶活力的影响

2.3.1 谷草转氨酶

不同养殖密度下银鲳幼鱼肾脏谷草转氨酶 (AST)的活力变化见图 2a。在各时间点(除 1d、2d、40d 外)高密度组幼鱼 AST 酶活力均高于中密度组和低密度组, 尤其是 5d 时达到峰值, 约为初始值的 3.1 倍, 分别是中、低密度组的 3.3 倍和 4.9 倍

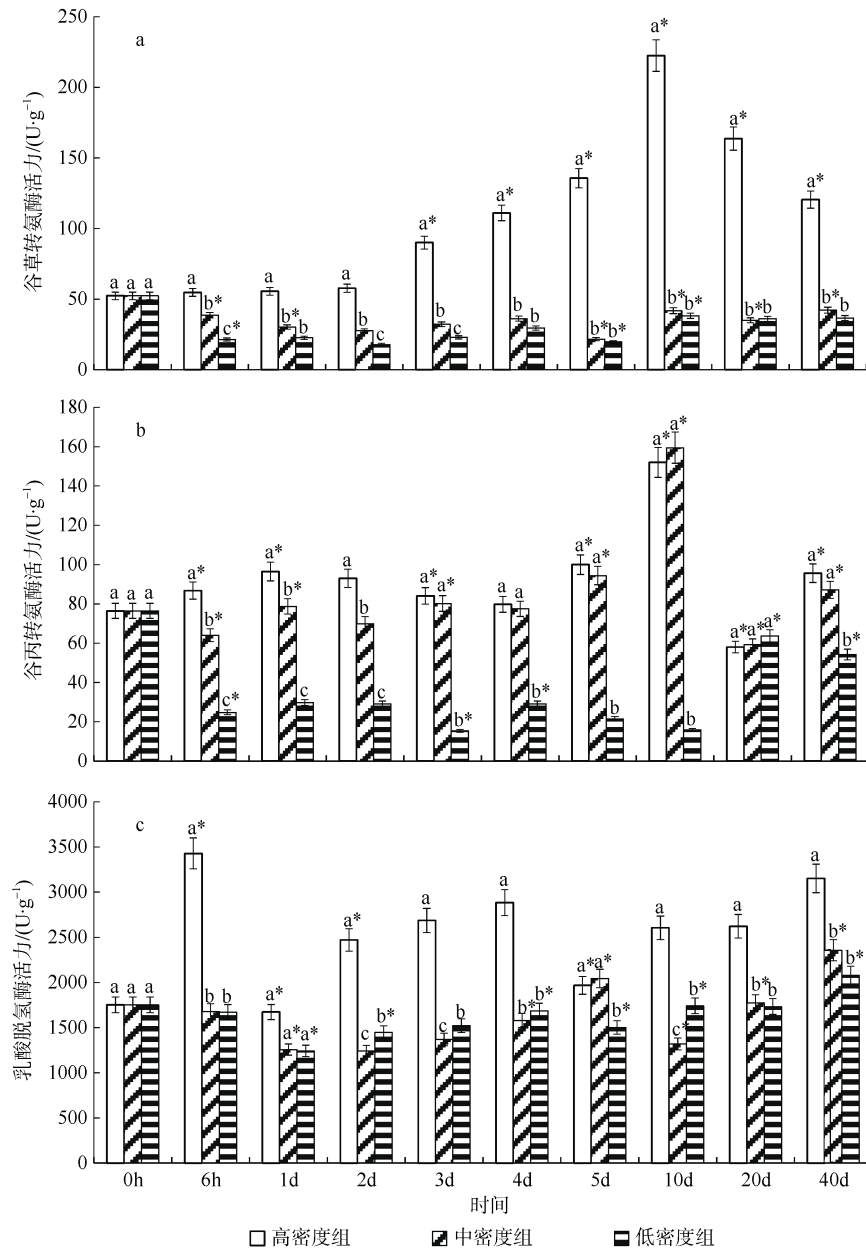


图 1 养殖密度对银鲳幼鱼肝脏谷草转氨酶(a)、谷丙转氨酶(b)、乳酸脱氢酶(c)活力的影响

*表示同一密度组与前一时间点比较有显著差异($p < 0.05$); 不同小写字母表示不同密度组在同一时间点差异显著($p < 0.05$)

Fig. 1 Effect of density on liver AST (a), ALT (b) and LDH (c) activity of juvenile *Pampus argenteus*. * indicates significant difference between different treatment times at the same density ($p < 0.05$), Different small letters above the bars indicate significant differences between different densities at the same time ($p < 0.05$)

($p < 0.05$), 此后开始回落, 40d 时与 0h 初始值接近。各时间点的中密度组幼鱼 AST 酶活力均高于低密度组, 且 6h、3d、4d 和 10d~40d 时两者存在显著差异($p < 0.05$); 中密度组的幼鱼 AST 酶在 4d 时为最大值 $48.59 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ 。低密度组的幼鱼 AST 酶活力呈逐渐下降趋势, 变化范围为 $10.06 \sim 31.19 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

2.3.2 谷丙转氨酶

不同养殖密度下银鲳幼鱼肾脏谷丙转氨酶

(ALT)的活力变化见图 2b。除 6h、1d 点外, 高密度组 ALT 活力均高于中密度组和低密度组, 2d~5d、20d 时间点显著高于中密度组与低密度组($p < 0.05$), 峰值出现在 3d, 是初始值的 2.2 倍。中密度组酶活力除 40d 外均高于低密度组, 峰值出现在 1d, 为 $52.06 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ 。低密度组的峰值也出现在 1d。高、中、低 3 个密度组的 ALT 酶活力都呈现先升高再下降的变化趋势。

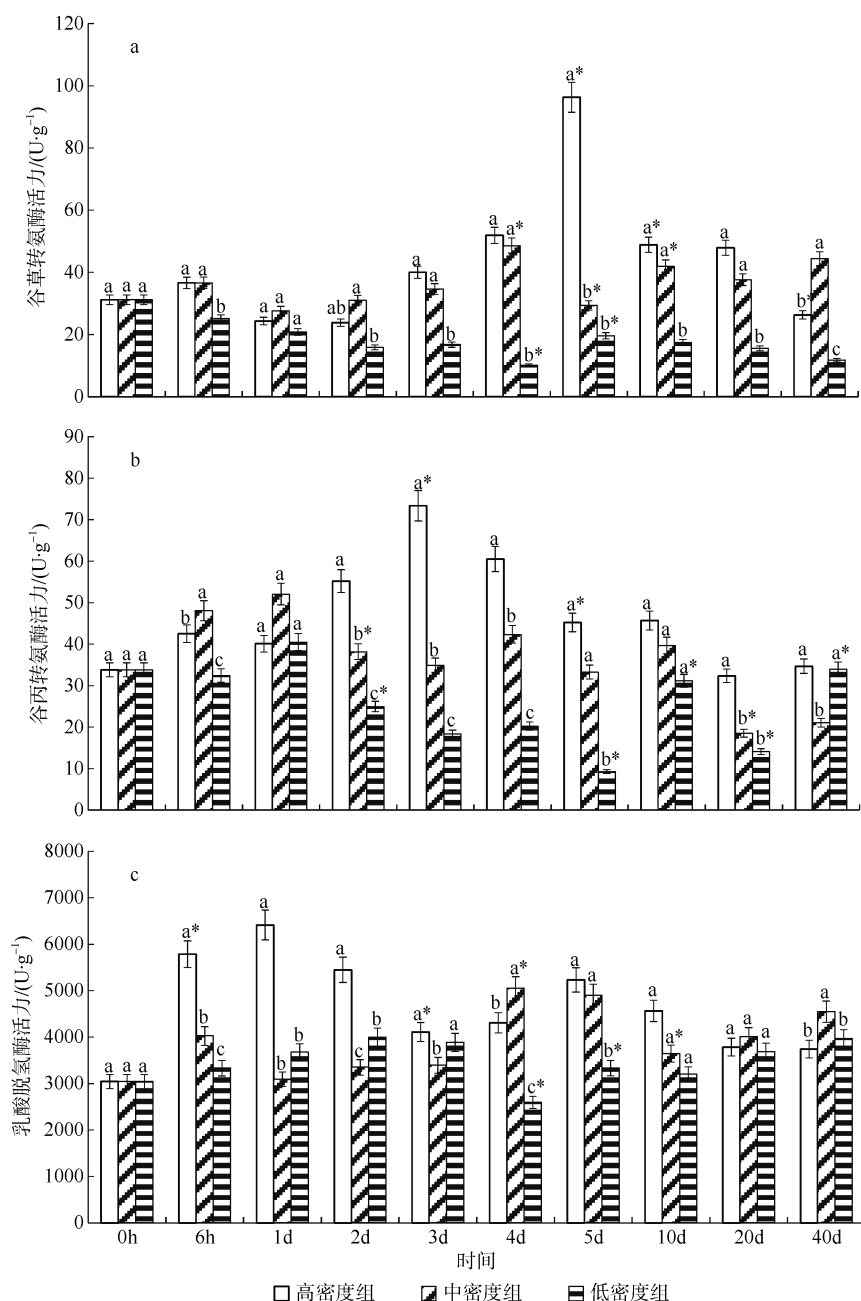


图2 养殖密度对银鲳幼鱼肾脏谷草转氨酶(a)、谷丙转氨酶(b)、乳酸脱氢酶(c)活力的影响

*表示同一密度组与前一时间点比较有显著差异($p < 0.05$); 不同小写字母表示不同密度组在同一时间点差异显著($p < 0.05$)

Fig. 2 Effect of density on kidney AST (a), ALT (b) and LDH (c) activity of juvenile *Pampus argenteus*. Asterisk (*) indicates significant difference between different treatment times at the same density ($p < 0.05$). Different small letters above the bars indicate significant differences between different densities at the same time ($p < 0.05$)

2.3.3 乳酸脱氢酶

不同养殖密度下银鲳幼鱼肾脏乳酸脱氢酶(LDH)的活力变化见图2c。在6h~2d, 高密度组LDH酶活力显著高于中密度和低密度($p < 0.05$), 此后与中低密度组没有显著性差异, 甚至还低于中密度组。高密度组LDH酶活力1d时达到峰值, 是初始值的2.1倍, 中密度组的峰值出现在4d, 低密度组酶活力相对变化较平稳。

2.4 养殖密度对银鲳幼鱼肝脏、肾脏3种代谢酶基因表达的影响

2.4.1 高密度对银鲳幼鱼肝脏、肾脏代谢酶基因表达的影响

高密度条件下银鲳幼鱼肝脏AST、ALT、LDH 3个基因mRNA表达量见图3。AST基因mRNA表达水平随着胁迫时间的推移呈先降低, 后升高再降低的趋势, 6h~4d呈下降趋势, 5d后开始表达上调, 至

10d 为表达量峰值, 约为初始值的 5 倍, 而后开始回落。ALT 基因 mRNA 表达水平也在 5d 时显著上调 ($p<0.05$), 至 10d 为表达量峰值, 约为初始值的 4.5

倍, 此后同样呈显著下降 ($p<0.05$)。LDH 基因 mRNA 表达量在 2d~10d 维持较高水平, 峰值也在 10d 时, 约为初始值的 4 倍。

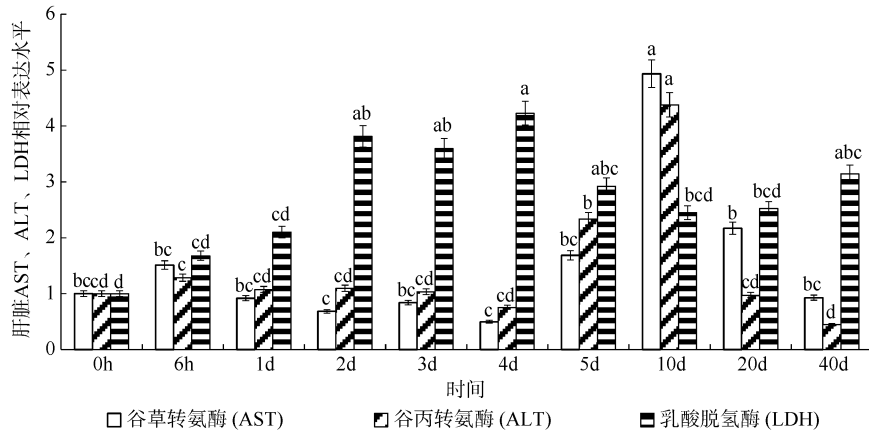


图 3 高密度组(90 尾·m⁻³)银鲳幼鱼肝脏 AST、ALT、LDH 3 种酶基因的 mRNA 表达变化
不同小写字母表示该种酶在不同时间点差异显著 ($p<0.05$)

Fig. 3 Change of mRNA relative expression on three liver enzymes in high density group of juvenile *Pampus argenteus*. Different small letters above the bars indicate significant differences between different times at the same enzyme ($p<0.05$)

高密度养殖下银鲳幼鱼肾脏中 AST、ALT、LDH 基因的 mRNA 表达量见图 4。AST 基因 mRNA 和 ALT 基因 mRNA 的表达均呈现单峰型, 呈先上升后下降的趋势。AST 基因 mRNA 在 5d 表达量最高, 约为初始

值的 3.5 倍; ALT 基因 mRNA 表达量高峰出现在 3d 时, 约为初始值的 2.5 倍; LDH 基因 mRNA 表达量呈双峰型, 最高峰值出现更早, 1d 时为峰值, 约为初始值的 2 倍, 10d 时为第二峰, 约为前一峰值的 0.81 倍。

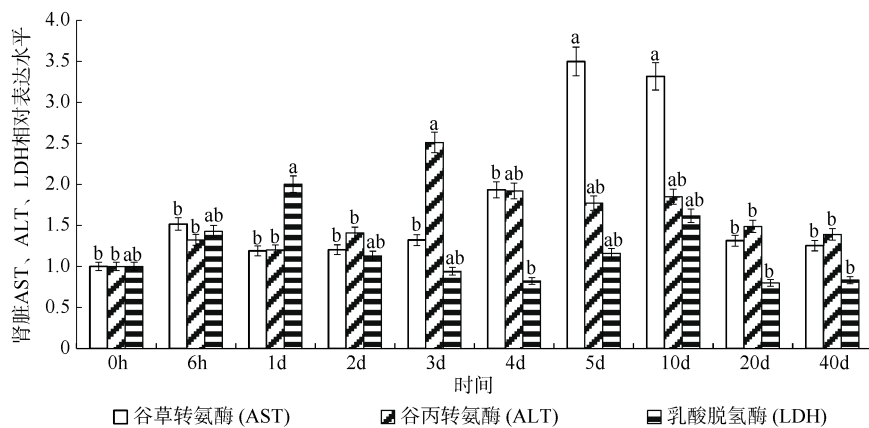


图 4 高密度组(90 尾·m⁻³)银鲳幼鱼肾脏 AST、ALT、LDH 3 种酶基因的 mRNA 表达变化
不同小写字母表示该种酶在不同时间点差异显著 ($p<0.05$)

Fig. 4 Change of mRNA relative expression on three kidney enzymes in high density group of juvenile *Pampus argenteus*. Different small letters above the bars indicate significant differences between different times at the same enzyme ($p<0.05$).

2.4.2 不同密度下银鲳幼鱼肝脏、肾脏中 AST、ALT、LDH 基因的 mRNA 表达差异

高密度、中密度和低密度 3 个处理组 10d 时幼鱼肝脏 AST、ALT、LDH 基因 mRNA 表达量见图 5。从图 5 中得知, 高密度组 AST 和 ALT 两种酶基因 mRNA 表达量均显著高于中、低密度组 ($p<0.05$), LDH 基因 mRNA 表达量虽高于中、低密度组, 但差

异不显著。

高密度、中密度以及低密度 3 个处理组水平下, 10d 后银鲳幼鱼肾脏 AST、ALT、LDH 基因 mRNA 表达量见图 6。高密度组 ALT 和 LDH 基因 mRNA 表达量显著高于中密度组和低密度组 ($p<0.05$), AST 基因 mRNA 表达量也高于中、低密度组, 但差异不显著。中、低密度组间 3 个基因表达均无显著差异 ($p>0.05$)。

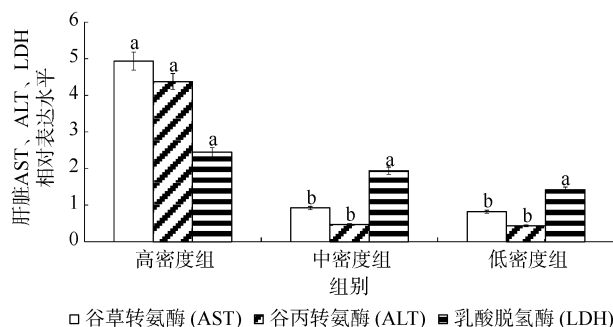


图5 不同密度下银鲳幼鱼肝脏AST、ALT、LDH 3种酶基因的mRNA表达差异

不同小写字母表示该种酶在不同密度下差异显著($p < 0.05$)

Fig. 5 Difference of mRNA relative expression on three liver enzymes between different density stresses of juvenile *Pampus argenteus*. Different small letters above the bars indicates significant differences between different densities at the same enzyme ($p < 0.05$)

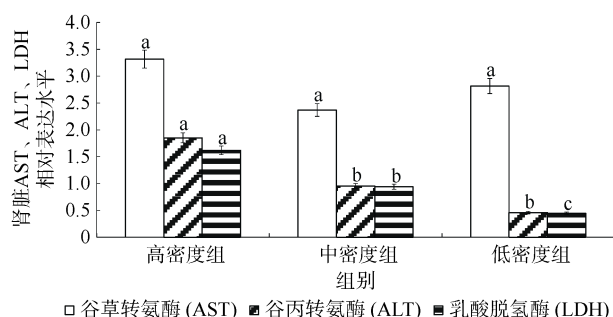


图6 不同密度下银鲳幼鱼肾脏AST、ALT、LDH 3种酶基因的mRNA表达差异

不同小写字母表示该种酶在不同密度组差异显著($p < 0.05$)

Fig. 6 Difference of mRNA relative expression on three kidney enzymes between different density stresses of juvenile *Pampus argenteus*. Different small letters above the bars indicate significant differences between different densities at the same enzyme ($p < 0.05$)

3 讨论

3.1 养殖密度对银鲳幼鱼生长的影响

通常情况下, 养殖密度与鱼类的生长呈负相关, 随着养殖密度的提高, 对养殖鱼类而言将出现拥挤胁迫, 鱼类的生长代谢率则会呈下降趋势(Shelbourn et al, 1973)。9.0 kg·m⁻³ 组日本黄姑鱼(*Nibea japonica*)幼鱼增重率显著低于1.9、3.8、7、7.6 kg·m⁻³ 组, 其成活率也有所下降(王跃斌等, 2017)。高密度养殖对草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、鲫鱼(*Carassius auratus*)、青石斑鱼(*Epinephelus awoara*)等的摄食、生长、个体免疫力等存在负面影响(李爱华, 1997; 夏华等, 2013; 张曦文等, 2012)。但是并非所有的养殖鱼类的生长代谢与养殖密度皆呈简单的正相关或负相关。放养密

度为2.1 kg·m⁻³的点带石斑鱼(*Epinephelus malabaricus*)实验组的增重率达到最大, 过高或过低的放养密度皆能滞缓该石斑鱼的生长和代谢速度(遼尚尉等, 2011)。尼罗罗非鱼苗种最佳的苗种培育密度为5.28~10.56 kg·m⁻³, 升高或降低密度苗种的生长都将减慢(孙大川等, 2009)。随着养殖密度的升高, 吉富罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)幼鱼特定生长率呈先上升后下降的变化(强俊等, 2011)。本实验中60尾·m⁻³中密度组的增重率与特定生长率分别为(235.19±10.23)%、(4.03±0.10)%, 显著高于低密度组(30尾·m⁻³) ($p < 0.05$), 略高于高密度组(90尾·m⁻³)但无显著性差异($p > 0.05$), 表明在实验设置的3个密度下, 过低或过高的养殖密度都不利于银鲳的生长, 这与相关研究结果一致(遼尚尉等, 2011; 孙大川等, 2009; 强俊等, 2011)。有学者认为, 高密度养殖使养殖鱼类体内的激素水平发生改变, 鱼体积极动员自身的能量储存物质, 以满足额外的能量需求, 加强糖异生途径使流向生长的能量逐渐减少, 从而使鱼体的生长受到负面的影响(张廷军等, 1998)。也有报道认为, 养殖鱼类生长受到抑制的原因在于个体的生存空间减少, 种间对于溶氧、饵料等资源竞争加剧, 从而导致个体的生长受到阻碍(Baker et al, 1990)。银鲳幼鱼在低密度下生长状况不及中密度组的原因可能与银鲳的群居习性有关, 过低的养殖密度反而会不利于其生长。研究指出, 集群性鱼类具有社会性, 集群性鱼类若单独饲养, 通常可以看到该个体行为古怪、进食量减少、生长速度减慢, 而当其集群生活时, 则会恢复为行为活泼、积极进食、生长加快的状态(李大鹏等, 2004)。上文提到的点带石斑鱼、罗非鱼等群居性鱼类也具有类似的互利性现象, 在各试验组中, 密度最低的实验组幼鱼的增重率和特定生长率出现显著低于其他各实验组的现象(遼尚尉等, 2011; Hoener et al, 1987)。

3.2 养殖密度对银鲳幼鱼肝脏、肾脏中3种代谢酶活力的影响

作为环境胁迫因子的高密度养殖会导致鱼对额外能量的需求增加, 从而增强糖原异生途径。在胁迫环境下, 鱼类会消耗糖类、乳酸、氨基酸等来满足能量的需求, 同时LDH、AST、ALT和其他相关酶活力也会有所变化(遼尚尉, 2010; Vijayan et al, 1990)。

研究表明, 在黄姑鱼(*Nibea albiflora*)的4个密度胁迫实验中, 60尾·m⁻³实验组黄姑鱼LDH活力显著高于其他3个密度组(薛宝贵等, 2013)。高密度

组(G40)点带石斑鱼幼鱼 LDH 酶活力最高, 且与两个低密度组(G10、G20)差异非常显著(逯尚尉等, 2010)。LDH 酶活力随养殖密度的增加而增加, 表明高密度养殖导致实验幼鱼产生应激胁迫作用, 影响了其正常的生理代谢活动。本实验中, 幼鱼肝脏、肾脏组织内的 LDH 酶活力随养殖密度的增加而增加, 设置的高密度组($90 \text{ 尾} \cdot \text{m}^{-3}$)对银鲳幼鱼造成了胁迫作用, 糖异生作用加强, 乳酸作为糖异生前体的优先替代物大量增加, 诱导 LDH 的合成与分泌, 使得 LDH 酶活力水平显著提升。这与相关研究结果相一致(逯尚尉, 2010; 薛宝贵等, 2013)。3h 急性拥挤胁迫的鲤(*Cyprinus carpio*)血清乳酸水平上升, 与对照组相比差异显著($p < 0.05$), 之后逐渐下降, 其中 12h~96h 血清乳酸水平一直处于下降和恢复的波动状态(于淼等, 2008)。本实验高密度组幼鱼肝脏、肾脏中的 LDH 酶活力在拥挤胁迫初期(0h~1d)显著增加, 并分别于 6h 和 1d 达到最大值, 而后总体呈下降趋势, 在胁迫中期(1d~5d)活力稍有提高, 而在胁迫后期(5d~40d)则没有显著变化, 说明在拥挤胁迫初期, 银鲳幼鱼主要利用乳酸进行糖异生活动, 诱导 LDH 的合成与分泌, 消耗自身乳酸产生丙酮酸来满足机体的需要。拥挤胁迫中、后期 LDH 活力变化不显著, 这被认为是鱼体会通过自身的调节机制快速遏制拥挤胁迫带来的不良影响(强俊等, 2014; 王春枝等, 2014)。本实验中随着养殖时间的延长, 银鲳幼鱼体内 LDH 酶活力的调节可能超过了鱼体自身的调节能力, 酶活力呈现急速下降的趋势。也可能在胁迫中期由其他糖异生相关的酶开始起主导作用, 而使得 LDH 酶活力有所降低。中密度组、低密度组 LDH 酶活力虽然某些时间点之间差异显著, 但整体没有如高密度组一样出现大幅度的变化, 而是呈不规则的波动起伏变化, 说明中、低密度胁迫对银鲳幼鱼 LDH 酶活力影响不如高密度组显著。

研究发现, 麦瑞加拉鲮鱼(*Cirrhinus mrigala*)和团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)受到拥挤胁迫后, ALT 和 AST 活力显著升高, 糖异生途径加强, 产生葡萄糖来对抗不利环境(Tejpal et al, 2009; 元成龙, 2016)。高密度组鲤血清中 ALT、AST 酶活力水平极显著高于低密度组和中密度组($p < 0.01$) (张磊等, 2007)。青石斑鱼血清的 ALT 酶活力及肝脏和鳃的 ALT 酶活力均随着养殖密度的增加而明显升高($p < 0.01$) (张曦文等, 2012)。施氏鲟(*Acipenser schrenckii*) AST 酶活力随着养殖密度的增大而显著升高(任源远, 2014)。本实验结果显示, 高密度组银

鲳幼鱼肾脏 ALT 酶活力水平总体上显著高于中、低密度组, 而高、中密度组幼鱼肝脏 ALT 酶活力水平显著高于低密度组。高密度组幼鱼肝脏 AST 酶活力显著大于中、低密度组, 肾脏 AST 酶活力水平除 1d、2d、40d 点外均高于中、低密度组, 特别是 5d 时显著高于中、低密度组($p < 0.05$)。这表明高密度组已经对养殖银鲳幼鱼造成了拥挤胁迫, 丙氨酸、天冬氨酸被大量利用产生能量, 使得 ALT、AST 酶活力水平显著提升, 这与相关研究结论(Tejpal et al, 2009; 任源远, 2014)相一致。中密度组幼鱼肝、肾组织中 AST 和 ALT 活力水平均普遍较高, 说明银鲳幼鱼在中密度($60 \text{ 尾} \cdot \text{m}^{-3}$)已经感受到了拥挤胁迫信号, 导致其在中密度养殖中也出现了拥挤胁迫症状, 表现为肝、肾组织中 AST 和 ALT 活力水平提高。尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)随着密度胁迫时间的延长, 鱼体内 AST、ALT 酶活力变化为先降低后升高再降低(强俊等, 2014)。史氏鲟的拥挤胁迫后 AST 酶活力水平在胁迫后的 5min 下降, 接下来的 8h 内持续升高, 而后 8h~3d 期间呈下降趋势, 最后一直上升至 15d 达到最高值(石小涛, 2006)。本实验高密度组幼鱼的肝脏、肾脏两组织内的 AST、ALT 酶活力水平均呈现先下降后上升再下降的趋势。因此, 银鲳幼鱼受拥挤胁迫后, 肝脏、肾脏内的 ALT、AST 酶活力变化趋势与尼罗罗非鱼、史氏鲟的密度胁迫实验较为吻合。结果表明, ALT、AST 酶主要在银鲳幼鱼受到拥挤胁迫的中期发生作用, 动员丙氨酸、天冬氨酸进入糖异生途径。而关于 ALT、AST 酶活力在实验后期有所下降, 有学者认为这与鱼体自身的调节机制有关, 增加糖异生相关酶活力, 在一定程度上降低了拥挤胁迫带来的不良影响, 从而 ALT、AST 酶活力开始呈下降趋势(强俊等, 2014; 王春枝等, 2014)。

3.3 养殖密度对银鲳幼鱼肝脏、肾脏代谢相关酶基因表达的影响

为进一步探讨 AST、ALT、LDH 代谢酶基因在不同养殖密度下是否参与了糖代谢中的糖异生作用, 本实验利用实时荧光定量 PCR 技术进行了验证。重点关注了高密度组银鲳幼鱼肝脏和肾脏两类组织内上述代谢酶 mRNA 表达量。比较了 3 个密度组在拥挤胁迫处理 10d 后银鲳幼鱼肝脏、肾脏的代谢酶 mRNA 表达量的结果表明, 代谢酶基因参与了拥挤胁迫下的糖异生途径。

实时荧光定量 PCR 结果显示, 高密度组幼鱼的肝脏、肾脏两组织内的 AST、ALT 基因 mRNA 表

达量变化趋势均与其酶活力水平变化趋势一致。幼鱼肾脏中的 LDH 基因 mRNA 表达量变化趋势与对应酶活力水平相吻合; 肝脏 LDH 基因 mRNA 表达量在 0h~4d 上调, 至 4d 达到最高值, 约为初始值的 4 倍, 而后一直呈下降趋势。与肝脏 LDH 酶活力变化不同的是, 6h 时 LDH 酶活力达到最大值, 而此时其 mRNA 表达量变化不显著。研究认为, 在胁迫前期, 鱼体可能利用先前自身合成存储的酶原, 随着体内酶不断地失活而后被降解, 相关基因开始转录、翻译以及合成, 因而 mRNA 响应在时间上出现了延迟(王春枝 等, 2014; 梁丛飞, 2015)。本实验胁迫 6h 后, 肝脏 LDH 活力水平显著提升, 而其 mRNA 表达水平并没有显著提高, 应该在胁迫前

期银鲳体内储存有部分酶原, 应激后酶原被激活为酶, 从而使得酶活力水平上升, 而基因 mRNA 表达并没有显著上调。本研究得到了酶活水平与对应的酶基因 mRNA 表达量之间的相互呼应, 结果表明高密度组对银鲳幼鱼代谢相关酶活力及其 mRNA 表达量产生了影响。

综上所述, 适当提高养殖密度对银鲳幼鱼的生长有促进作用。但在高密度养殖下, 银鲳幼鱼则会受到拥挤胁迫的影响, 肝脏、肾脏中 LDH、ALT、AST 酶活力显著升高。LDH 主要参与胁迫早期的糖异生行为, 而 ALT、AST 则主导胁迫后期的氨基酸异生途径, 这些生理代谢过程也从相关酶基因 mRNA 表达量变化得到了印证, 说明这些胁迫应激反应受相关基因的调控。

参考文献 References

- 李爱华, 1997. 拥挤胁迫对草鱼血浆皮质醇、血糖及肝脏中抗坏血酸含量的影响[J]. 水生生物学报, 21(4): 384–386. LI AIHUA, 1997. Effects of crowding stress on plasma cortisol, glucose and liver ascorbic acid in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 21(4): 384–386 (in Chinese with English abstract).
- 李大鹏, 庄平, 严安生, 等, 2004. 光照、水流和养殖密度对史氏鲟稚鱼摄食、行为和生长的影响[J]. 水产学报, 28(1): 54–61. LI DAPENG, ZHUANG PING, YAN ANSHENG, et al, 2004. The influences of illumination, water current and stocking density on feeding, behavior and growth in juveniles *Acipenser schrenckii*[J]. Journal of Fisheries of China, 28(1): 54–61 (in Chinese with English abstract).
- 梁丛飞, 2015. 尼罗罗非鱼耐盐碱选育一代耐受性、生长性能及鳃 Na⁺/HCO³⁻ 共转运子、碳酸酐酶基因表达[D]. 硕士学位论文, 上海: 上海海洋大学. LIANG CONGFEI, 2015. Tolerance, growth and branchial mRNA expression of Na⁺/HCO³⁻ cotransporter and CA of the first selected generation of *Oreochromis niloticus* in saline and alkaline water[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University (in Chinese with English abstract).
- 遯尚尉, 2010. 不同饵料、密度和光周期对点带石斑鱼 (*Epinephelus malabaricus*) 幼鱼的影响[D]. 硕士学位论文, 南京: 南京农业大学. LU SHANGWEI, 2010. Effect of different diets, stocking densities and photoperiods on juvenile *Epinephelus malabaricus*[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University (in Chinese with English abstract).
- 遯尚尉, 刘兆普, 余燕, 2011. 密度胁迫对点带石斑鱼幼鱼生长、代谢的影响[J]. 中国水产科学, 18(2): 322–328. LU SHANGWEI, LIU ZHAOPU, YU YAN, 2011. Effects of density stress on growth and metabolism of juvenile *Epinephelus malabaricus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 18(2): 322–328 (in Chinese with English abstract).
- 彭士明, 施兆鸿, 孙鹏, 等, 2010. 养殖密度对银鲳幼鱼生长及组织生化指标的影响[J]. 生态学杂志, 29(7): 1371–1376. PENG SHIMING, SHI ZHAOHONG, SUN PENG, et al, 2010. Effects of breeding density on the growth and tissues biochemical indices of juvenile silver pomfret (*Pampus argenteus*)[J]. Chinese Journal of Ecology, 29(7): 1371–1376 (in Chinese with English abstract).
- 元成龙, 2016. 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]. 硕士学位论文, 武汉: 华中农业大学. QI CHENGLONG, 2016. Effect of stocking density and nitrite on physiological functions and muscle quality of blunt snout bream *Megalobrama amblycephala* juveniles[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University (in Chinese with English abstract).
- 强俊, 徐跑, 何杰, 等, 2011. 氨氮与拥挤胁迫对吉富品系尼罗罗非鱼幼鱼生长和肝脏抗氧化指标的联合影响[J]. 水产学报, 35(12): 1837–1848. QIANG JUN, XU PAO, HE JIE, et al, 2011. The combined effects of external ammonia and crowding stress on growth and biochemical activities in liver of (GIFT) Nile tilapia juvenile (*Oreochromis niloticus*)[J]. Journal of Fisheries of China, 35(12): 1837–1848 (in Chinese with English abstract).
- 强俊, 杨弘, 何杰, 等, 2014. 3 种品系尼罗罗非鱼生长及高密度胁迫后生理响应变化的比较[J]. 中国水产科学, 21(1): 142–152. QIANG JUN, YANG HONG, HE JIE, et al, 2014. Comparison on growth performance in three different strains of Nile tilapia and physiological responses after short-term high stocking density stress[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 21(1): 142–152 (in Chinese with English abstract).
- 任源远, 2014. 养殖密度对施氏鲟大规格鱼种生长性能及血液生理生化组分的影响[D]. 硕士学位论文, 山东: 中国海洋大学. REN YUANYUAN, 2014. Effects of stocking density on growth performance and blood physiological and biochemical components in large-sized juvenile Amur sturgeon[D]. Shandong: Ocean University of China (in Chinese with English abstract).
- 石小涛, 2006. 史氏鲟在拥挤胁迫中的应激反应[D]. 硕士学位

- 论文, 华中农业大学, 2006. SHI XIAOTAO, 2006. The stress-influences of rearing densities on juvenile Amur sturgeon, *Acipenser schrenckii*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University (in Chinese with English abstract).
- 孙大川, 谭洪新, 罗国芝, 等, 2009. 养殖密度对宝石鲈生长性能和血液生化指标的影响[J]. 渔业现代化, 36(2): 12–15.
- SUN DACHUAN, TAN HONGXIN, LUO GUOZHI, et al, 2009. Effect of stocking density on growth and blood biochemical parameters of *Scortum barcoo*[J]. Fishery Modernization, 36(2): 12–15 (in Chinese with English abstract).
- 王春枝, 李忠, 梁宏伟, 等, 2014. 低氧胁迫对鲢线粒体 ATP 酶活性及 F1- δ 基因表达的影响[J]. 中国水产科学, 21(3): 454–463.
- WANG CHUZH, LI ZHONG, LIANG HONGWEI, et al, 2014. The effects of hypoxia stress on mitochondrial ATPase activity and the expression of F1- δ in *Hypophthalmichthys molitrix*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 21(3): 454–463 (in Chinese with English abstract).
- 王文博, 汪建国, 李爱华, 等, 2004. 拥挤胁迫后鲫鱼血液皮质醇和溶菌酶水平的变化及对病原的敏感性[J]. 中国水产科学, 11(5): 408–412.
- WANG WENBO, WANG JIANGUO, LI AIHUA, et al, 2004. Changes of cortisol and lysozyme levels in *Carassius auratus* blood after crowding stress and the fish sensitivity to pathogen[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 11(5): 408–412 (in Chinese with English abstract).
- 王跃斌, 胡成硕, 胡则辉, 等, 2017. 养殖密度对日本黄姑鱼幼鱼生长及非特异性免疫的影响[J]. 海洋渔业, 39(1): 51–57.
- WANG YUEBIN, HU CHENGSHUO, HU ZEHUI, et al, 2017. Effects of different stocking densities on growth performance and non-specific immunity of juvenile *Nibea japonica*[J]. Marine Fisheries, 39(1): 51–57 (in Chinese with English abstract).
- 夏华, 李威名, 陈阿琴, 等, 2013. 两种养殖密度下鲫鱼生长和免疫酶活性的比较[J]. 广东农业科学, 40(12): 130–133.
- XIA HUA, LI WEIMING, CHENG AQIN, et al, 2013. Comparative analysis of growth and immune enzyme activities of *Carassius auratus* under two densities[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 40(12): 130–133 (in Chinese with English abstract).
- 薛宝贵, 楼宝, 徐冬冬, 等, 2013. 密度胁迫对黄姑鱼幼鱼生长、代谢及非特异性免疫的影响[J]. 渔业科学进展, 34(2): 45–51.
- XUE BAOGUI, LOU BAO, XU DONGDONG, et al, 2013. Impact of density stress on growth, metabolism and non-specific immune functions of juvenile *Nibea albiflora*[J]. Progress in fishery sciences, 34(2): 45–51 (in Chinese with English abstract).
- 张建明, 郭柏福, 高勇, 2013. 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, 20(3): 592–598.
- ZHANG JIANMING, GUO BOFU, GAO YONG, 2013. Effects of chronic crowding stress on growth, feeding, and behavior in Chinese sturgeon *Acipenser sinensis* F₂ juveniles[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 20(3): 592–598 (in Chinese with English abstract).
- 于淼, 樊启学, 程鹏, 等, 2008. 急性拥挤胁迫对鲤血液中皮质醇及几项生化指标的影响[J]. 淡水渔业, 38(4): 20–24.
- YU MIAO, FAN QIXUE, CHENG PENG, et al, 2008. Effects of acute crowding stress on cortisol and several biochemical indexes in *Cyprinus carpio* serum[J]. Freshwater Fisheries, 38(4): 20–24 (in Chinese with English abstract).
- 张磊, 樊启学, 赵志刚, 等, 2007. 慢性拥挤胁迫对鲤生长及血液生化指标的影响[J]. 大连海洋大学学报, 22(6): 465–469.
- ZHANG LEI, FAN QIXUE, ZHAO ZHIGANG, et al, 2007. The effects of chronic crowding stress on growth and blood Biochemical indexes in common carp *Cyprinus carpio*[J]. Journal of Dalian Fisheries University, 22(6): 465–469 (in Chinese with English abstract).
- 张廷军, 杨振才, 孙儒泳, 1998. 鱼类对高密度环境的适应[J]. 水产科技情报, 25(3): 110–113.
- ZHANG TINGJUN, YANG ZHENCAI, SUN RUYONG, 1998. The Acclimation of Fishes to High Stocking Density[J]. Fisheries Science & Technology Information, 25(3): 110–113 (in Chinese with English abstract).
- 张曦文, 吴垠, 贺茹靖, 等, 2012. 循环水养殖模式下养殖密度对青石斑鱼生长及生理指标的影响[J]. 大连海洋大学学报, 27(6): 518–522.
- ZHANG XI WEN, WU YIN, HE RUJING, et al, 2012. The effects of stocking density on growth and physiological indices of grouper *Epinephelus awoara* in recirculating aquaculture[J]. Journal of Dalian Ocean University, 27(6): 518–522 (in Chinese with English abstract).
- Allen K O, 1974. Effects of stocking density and water exchange rate on growth and survival of channel catfish *Ictalurus punctatus* in circular tanks[J]. Aquaculture, 4: 29–39.
- Baker R F, Ayles G B, 1990. The effects of varying density and loading level on the growth of arctic charr (*Aalvelinus alpinus* L.) and rainbow trout[J]. Journal of the World Aquaculture Society, 121, 313–326.
- Demeal N A, 1978. Some characteristics of carbohydrate metabolism in fish[J]. Oceanis (Doc. Oceanogr.), 4: 359–365.
- Hoener, G, Rosenthal H, Kruener G, 1987. Social interaction of juvenile *Sarotherodon galilaeus* in laboratory aquaria[J]. Journal of Aquaculture in the Tropics, 2(1): 45–58.
- Jørgensen E H, Christiansen J S, Jobling M, 1993. Effects of stocking density on food intake, growth performance and oxygen consumption in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*)[J]. Aquaculture, 110(2): 191–204.
- Shelbourn J E, Brett J R, Shirahata S, 1973. Effect of Temperature and Feeding Regime on the Specific Growth Rate[J]. Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 30(8): 1191–1194.
- Tejpal C S, Pal A K, Sahu N P, et al, 2009. Dietary supplementation of L-tryptophan mitigates crowding stress and augments the growth in *Cirrhinus mrigala* fingerlings[J]. Aquaculture, 293(3–4): 272–277.
- Vijayan M M, Ballantyne J S, Leatherland J F, 1990. High stocking density alters the energy metabolism of brook charr, *Salvelinus fontinalis*[J]. Aquaculture, 88(3): 371–381.