

水温对棘胸蛙(*Paa spinosa*)蝌蚪行为及尾部皮肤和肝脏相关功能酶活力的影响*

朱卫东^{1,2} 任凤芝¹ 申屠琰² 邹李昶³ 王志铮^{1①}

(1. 浙江海洋大学 舟山 316022; 2. 余姚市水产技术推广中心 余姚 315040; 3. 宁波市江北区农林水利局 宁波 315020)

摘要 以 1 月龄棘胸蛙蝌蚪[体长(1.694±0.121)cm, 体重(0.548±0.062)g]为实验对象, 在观察水温对蝌蚪行为和尾部皮肤表观色泽 Hunter *L*、*A*、*B* 值影响的基础上, 设置 19°C(对照组)、21.5°C、23°C、24.5°C、26°C 五个水温梯度, 并以 96h 为水温胁迫时长, 12d 为水温恢复时长, 研究了水温胁迫及恢复条件下棘胸蛙蝌蚪尾部皮肤 ATP 酶和抗氧化酶(SOD 和 CAT), 以及肝脏抗氧化酶(SOD, CAT, GSH)活力的变化特征。结果表明: (1) 棘胸蛙蝌蚪分布水层、集群状况、个体移动率均与其培育水温关系密切, 14°C 和 26°C 分别为可显著改变蝌蚪分布水层和个体移动率的水温临界; (2) *L* 值可作为表征蝌蚪尾部皮肤感应培育水温的指示色差, 水温 26°C 为致其发生显著改变的高温临界; (3) 蝌蚪尾部皮肤 ATP 酶耐受水温的最适高限为 24.5°C, 适宜范围为 21.5—24.5°C; (4) 蝌蚪尾部皮肤和肝脏表露 SOD 酶活力的最适水温均为 23°C, 而表露 CAT 酶活力的最适水温则分别为 23°C 和 24.5°C, 水温 26°C 时肝脏 SOD 酶已表露受损; (5) 蝌蚪肝脏表露 GSH 酶活力的最适水温为 24.5°C, 水温 26°C 为该酶表露受损的高温临界。

关键词 水温; 棘胸蛙蝌蚪; 行为; 色差; 尾部; 肝脏; ATP 酶; 抗氧化酶

中图分类号 S966 **doi:** 10.11693/hyhz20141100301

棘胸蛙(*Paa spinosa*)隶属于无尾目(Anura)、蛙科(Ranidae)、棘蛙属(*Paa*), 系主布于我国南方丘陵海拔 500—600m 溪流区的特有大型水产经济动物(林光平等, 1990), 具有很高的食用、保健和药用价值, 是一种极具养殖开发潜力的名贵蛙种。棘胸蛙繁殖期为 5—9 月(陈平等, 2012), 属一年多次产卵类型(刘元楷等, 1990; 耿宝荣等, 2004), 故在自然水温条件下, 中、晚期孵化的蝌蚪需延至次年 5—6 月方可完成变态(杨伟国等, 1990), 致使其养成周期明显延长, 管理成本和养殖风险显著提高。因此, 开展人控条件下蝌蚪的适温性研究, 以有效缩短蝌蚪阶段培育周期并显著提高变态成活率, 无疑对于促进该蛙的集约化健康养殖具有重要现实意义。

棘胸蛙为变温动物, 培育水温往往与其运动强

度和呼吸代谢水平有着极为密切的关系。已有研究也表明, 水温为可改变棘胸蛙行为习性和影响其生长发育的重要环境因子。据报道, 繁殖期雄性棘胸蛙体温与其鸣叫时长和音节时长均呈显著负相关(陈平等, 2012); 幼、成蛙均进入冬眠状态的临界水温为 8°C(王爱民等, 2002), 适宜摄食和生长发育的水温范围为 15—34°C, 其中以 18—30°C 为最佳(胡石柳, 1991); 蝌蚪孵化率达 80%以上的培育水温为 20—23°C, 且水温对蝌蚪表型生长具显著影响(陈雯等, 2010), 23°C 为最利于蝌蚪快速增长的水温(陶志英等, 2015), 在相同营养条件下蝌蚪变态所需时长及变态时的体长和体重均随温度上升而减少, 反之亦然(肖调义等, 2004; 赵蒙蒙等, 2014)。但迄今国内外尚未见有关水温胁迫下棘胸蛙蝌蚪行为和生理调节方面的

*余姚市与浙江海洋学院市院合作项目: 棘胸蛙集约化高效养殖关键技术集成与综合示范, 2013—2016; 宁波市鄞州区科技攻关项目: 棘胸蛙驯养与繁育技术研究与示范, 2013—2014。朱卫东, 高级工程师, 硕士, E-mail: 476585277@qq.com

通讯作者: 王志铮, 教授/研究员, E-mail: wzz_1225@163.com

收稿日期: 2014-11-03, 收修改稿日期: 2015-12-28

系统报道。鉴于此,本文作者为探明棘胸蛙蝌蚪对水温的耐受与响应特征,并据此找寻最适养殖温度,在观察水温对棘胸蛙蝌蚪行为和尾部表观色泽影响的基础上,以兼具运动和呼吸功能的尾部与作为其机体代谢中枢的肝脏为靶标,较系统地开展了水温对棘胸蛙蝌蚪尾部、肝脏相关功能酶活力的影响研究,以期为指导该蛙蝌蚪的科学养殖提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 棘胸蛙蝌蚪 购自浙江省余姚市龙坑石蛙养殖场,运回实验基地经停饲驯养 2d(驯养水温 19°C,为余姚市龙坑石蛙养殖场蝌蚪培育水温)后,选取其中肢体完好、规格相近、反应敏捷的 1 月龄健壮个体作为实验对象,具体规格为体长(1.694±0.121)cm、体质量(0.548±0.062)g。

1.1.2 理化条件 以自然曝气 48h,水温(24±0.2)°C、pH 7.30±0.01、DO (7.30±0.01)mg/L 的自来水为实验水源,水质符合《NY 5051-2001 无公害食品 淡水养殖用水水质》(中华人民共和国农业部,2001)要求。本研究以直径为 32cm 的白色圆形塑料盆为实验容器单元(实验实际容积为 5L),并均采用 SPX-250B-2 型生化培养箱(温控范围:2—60°C)调控驯养及实验水温。

1.1.3 检测试剂盒 所用 ATP、CAT、GSH-Px 和 SOD 酶活力测试盒均购自南京建成生物工程研究所,以岛津 UV-1240 型紫外可见分光光度计为检测仪器,测定步骤及计算方法按所附说明书。

1.2 实验方法

1.2.1 水温胁迫下蝌蚪行为及尾部皮肤表观色泽 Hunter L、A、B 值的观测 设置 14、18、22、26 和 30°C 五个实验水温处理组(每一处理重复 3 次,每个重复各投放蝌蚪 10ind),以 96h 为实验周期,采用静水停饲实验法,连续观察其水层分布、集群状况与个体移动率(以 30s 为间隔,用有效像素 1200 万的尼康 COOLPIX S570 型照相机随机拍摄 3 次,并统计各实验水温处理组内发生位移的蝌蚪百分比),并于实验结束时刻,借助 CR-400 型色差分析仪分别测定实验蝌蚪尾部皮肤的黑、白斑表观色泽 Hunter L、A、B 值,每一实验水温处理组各任测实验蝌蚪 5 ind。

1.2.2 水温胁迫及恢复后蝌蚪尾部皮肤组织和肝脏相关功能酶活力的测定 设置 19°C(驯养对照组)、21.5、23、24.5 和 26°C 五个实验水温处理组(每一处

理重复 3 次,每个重复各放蝌蚪 10 ind),采用静水停饲实验法,以 96h 为水温胁迫时长,12d 为水温恢复(恢复至驯养水温 19°C)时长,以 24h、48h、72h、96h、6d、12d 为测定时点,开展水温对棘胸蛙蝌蚪尾部 ATP 酶和抗氧化酶(SOD 和 CAT),以及肝脏抗氧化酶(SOD, CAT, GSH)活力的影响实验。每一测定时点从各实验水温处理组中任取实验蝌蚪 3 ind,于冰盘上解剖取尾部皮肤组织和肝脏后,标号保存于-80°C 超低温冰箱备测。

1.3 数据处理

采用 LSD 多重比较法分别检验不同水温处理组间尾部皮肤黑、白斑表观色差及相关功能酶活力的差异($P < 0.05$ 为显著水平)。上述统计分析均借助 SPSS 17.0 软件来完成。

2 结果

2.1 行为

由表 1 可见,棘胸蛙蝌蚪的行为与其所处水温环境关系密切,主要表现为:(1) 14°C 实验组蝌蚪静止于实验容器底部,18°C 和 22°C 实验组蝌蚪出没于整个实验容器,而 26°C 和 30°C 实验组蝌蚪则仅分布于水表面;(2) 诸实验组别中,仅 14°C 和 30°C 实验组蝌蚪无集群现象;(3) 蝌蚪个体移动率随水温升高呈逐渐增大趋势,18°C 和 22°C 实验组的个体移动率均低于 50%,而 26°C 和 30°C 实验组蝌蚪的个体移动率则分别达 86.67% 和 100%。综上可知,水温 26°C 和 14°C 分别为可显著改变蝌蚪分布水层和个体移动率的高、低温临界。

表 1 不同水温条件下棘胸蛙蝌蚪的活动状况
Tab.1 Activity of *P. spinosa* tadpole in different water temperatures

实验水温	14°C	18°C	22°C	26°C	30°C
分布区域	容器底部	整个容器	整个容器	水表面	水表面
群聚特征	分散	集群	集群	集群	分散
个体移动率	0	33.33%	43.33%	86.67%	100%

2.2 尾部表观色泽

由表 2 可见,棘胸蛙蝌蚪尾部皮肤黑、白斑表观色泽的 A、B 值均无组间差异($P > 0.05$),而 L 值则均呈 14°C 实验组≈18°C 实验组≈22°C 实验组<26°C 实验组<30°C 实验组,表明水温增加可显著改变用以表征棘胸蛙蝌蚪尾部皮肤亮度的 L 值,即 L 值可作为表征蝌蚪感应环境水温增高的指示色差,其中水温 26°C 为可致蝌蚪尾部表观色泽发生显著改变的高温临界。

表 2 不同水温条件下棘胸蛙蝌蚪尾部表观色泽的 Hunter L、A、B 值
Tab.2 The Hunter L, A, B values of *P. spinosa* tadpole tail in different water temperatures

部位	指标	实验水温				
		14°C	18°C	22°C	26°C	30°C
黑斑	L	7.971±0.764 ^a	8.008±0.558 ^a	8.746±0.944 ^a	10.919±0.922 ^b	16.156±1.604 ^c
	A	1.064±0.108 ^a	1.030±0.127 ^a	0.962±0.094 ^a	1.205±0.104 ^a	1.167±0.109 ^a
	B	3.148±0.365 ^a	3.219±0.363 ^a	2.993±0.223 ^a	2.952±0.278 ^a	3.094±0.403 ^a
白斑	L	20.955±2.221 ^a	21.037±2.336 ^a	21.844±2.066 ^a	25.024±1.789 ^b	35.05±3.408 ^c
	A	1.232±0.156 ^a	1.052±0.121 ^a	0.923±0.079 ^a	1.020±0.101 ^a	0.957±0.089 ^a
	B	7.181±0.861 ^a	7.046±0.452 ^a	7.147±0.551 ^a	7.106±0.604 ^a	6.996±0.517 ^a

同一行上标不同字母表示具显著差异($P<0.05$), 字母相同表示无差异

2.3 ATP 酶

由图 1 可见, 蝌蚪尾部皮肤 ATP 酶活力在水温胁迫及恢复条件下的变化特征主要表现为: (1) 水温胁迫阶段, 各测定时点的酶活力随水温升高均呈以 19°C 实验组(对照组)为最小($P<0.05$)和 24.5°C 实验组为最大($P<0.05$)的先升后降趋势, 即 24.5°C 为蝌蚪尾部皮肤 ATP 酶耐受水温胁迫的最适高限; (2) 水温恢复阶段, 各测定时点酶活力随恢复前实验水温的升高均保持以 26°C 实验组与对照组持平($P>0.05$) 的先升后降趋势, 其中恢复 6d 时的酶活力以 23°C 实验组为最大($P<0.05$), 而 21.5°C 实验组和 24.5°C 实验组间的酶活力则无显著差异($P>0.05$), 恢复 12d 时 21.5°C 实验组、23°C 实验组和 24.5°C 实验组间的酶活力均无显著差异($P>0.05$), 即 21.5—24.5°C 为蝌蚪尾部皮肤 ATP 酶耐受温降胁迫的适温范围。

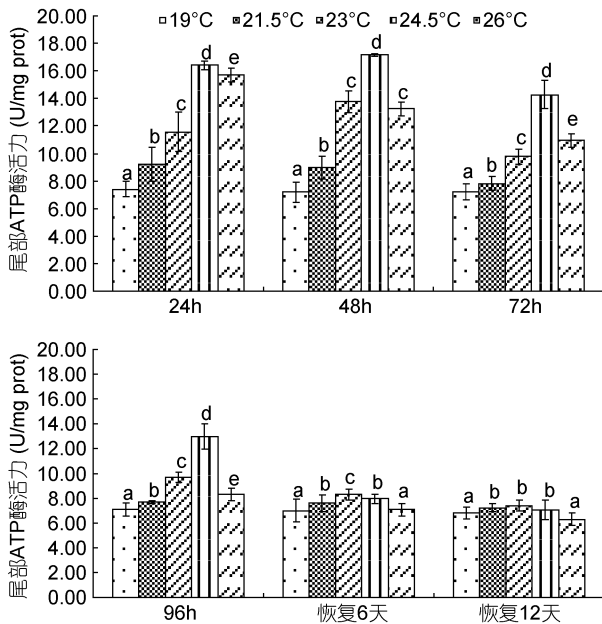


图 1 不同温度条件下棘胸蛙蝌蚪尾部 ATP 酶活力的变化
Fig.1 The ATP activity in *P. spinosa* tadpole tail in different water temperatures

2.4 SOD 酶

由图 2 可见, 蝌蚪尾部皮肤 SOD 酶活力在水温胁迫及恢复条件下的变化特征主要表现为: (1) 水温胁迫阶段, 尾部皮肤各测定时点的酶活力均以对照组为最小($P<0.05$), 随实验时间推移, 表露酶活力最大值的实验组别依次由 26°C 实验组、24.5°C 实验组逐渐过渡至 23°C 实验组, 即 23°C 为蝌蚪尾部皮肤 SOD 酶耐受水温胁迫的最适高限; (2) 水温恢复阶段, 尾部皮肤各测定时点的酶活力仍均以对照组为最小($P<0.05$), 恢复 6d 时 23°C 实验组、24.5°C 实验组和 26°C 实验组间的酶活力均无显著差异($P>0.05$), 且均显著大于 21.5°C 实验组, 恢复 12d 时的酶活力以 26°C 实验组为最大($P<0.05$), 24.5°C 实验组则与 21.5°C 实验组持平($P>0.05$), 而 23°C 实验组均显著小于 21.5°C 实验组和 24.5°C 实验组($P<0.05$), 即降温胁迫后蝌蚪尾部皮肤 SOD 酶的活跃度以 23°C 实验组为最大, 表明蝌蚪尾部皮肤 SOD 酶耐受温降胁迫的最适水温为 23°C, 适宜水温范围为 21.5—24.5°C。

由图 3 可见, 蝌蚪肝脏 SOD 酶活力在水温胁迫及恢复条件下的变化特征主要表现为: (1) 水温胁迫阶段, 肝脏各测定时点的酶活力均以对照组为最大($P<0.05$)和 26°C 实验组为最小($P<0.05$), 其中 23°C 实验组的酶活力均显著小于同一测定时点的 21.5°C 实验组和 24.5°C 实验组($P<0.05$), 即以水温 23°C 实验组为参照, 其两侧实验组的肝脏 SOD 酶活力均会出现一定程度的高企, 表明 23°C 为肝脏 SOD 酶处于未受胁迫状态下的水温, 水温 26°C 时该酶已表露受损; (2) 水温恢复阶段, 对照组各测定时点的肝脏 SOD 酶活力均与 21.5°C 实验组持平($P>0.05$), 且两者均显著大于其它实验组($P<0.05$), 恢复 6d 时 23°C 实验组、24.5°C 实验组和 26°C 实验组间的酶活力均无显著差异($P>0.05$), 而恢复 12d 时 23°C 实验组的酶活力则均显著大于 24.5°C 实验组和 26°C 实验组($P<0.05$), 即

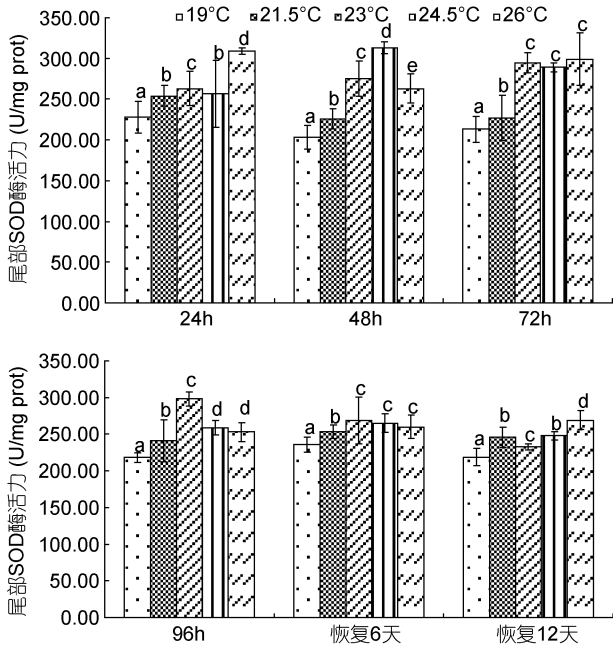


图2 不同温度条件下棘胸蛙蝌蚪尾部 SOD 酶活力的变化
Fig.2 The SOD activity in *P. spinosa* tadpole tail in different water temperatures

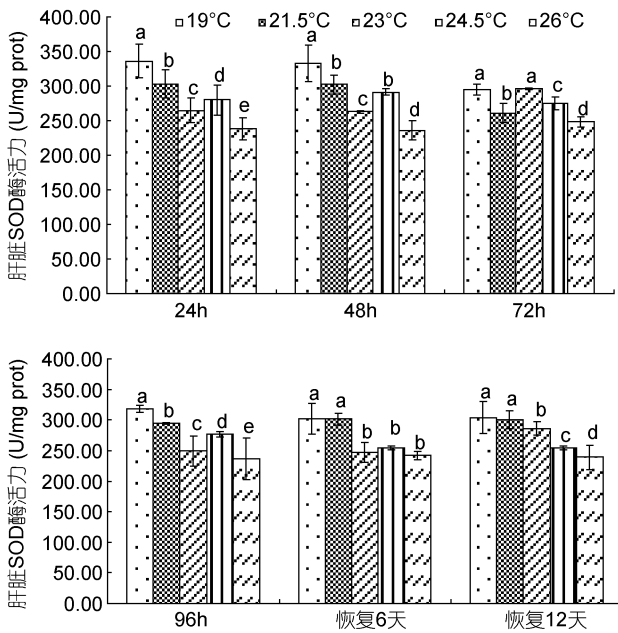


图3 不同温度条件下棘胸蛙蝌蚪肝脏 SOD 酶活力的变化
Fig.3 The SOD activity in *P. spinosa* tadpole liver in different water temperatures

23°C 为蝌蚪肝脏 SOD 酶耐受降温胁迫的适温上限。综上可知, 蝌蚪尾部皮肤和肝脏表露 SOD 酶活力的最适水温均为 23°C。

2.5 CAT 酶

由图 4 可见, 蝌蚪尾部皮肤 CAT 酶活力在水温胁迫及恢复条件下的变化特征主要表现为: (1) 水温胁迫

阶段, 尾部皮肤各观测时点的 CAT 酶活力均以对照组为最小($P < 0.05$), 随实验时间推移, 表露酶活力最大值的实验组别依次由 26°C 实验组、24.5°C 实验组逐渐过渡至 23°C 实验组, 即 23°C 为蝌蚪尾部皮肤表露 CAT 酶活力的最适水温; (2) 水温恢复阶段, 各测定时点的酶活力随恢复前实验水温的升高均保持以 24.5°C 实验组为最大($P < 0.05$)的先升后降趋势, 其中 26°C 实验组恢复 6d 和 12d 时的酶活力分别与对照组和 21.5°C 实验组持平($P > 0.05$), 即降温胁迫下蝌蚪尾部皮肤 CAT 酶的活跃度以 24.5°C 实验组为最大, 而 26°C 则为蝌蚪尾部皮肤 CAT 酶耐受降温胁迫的临界高温。

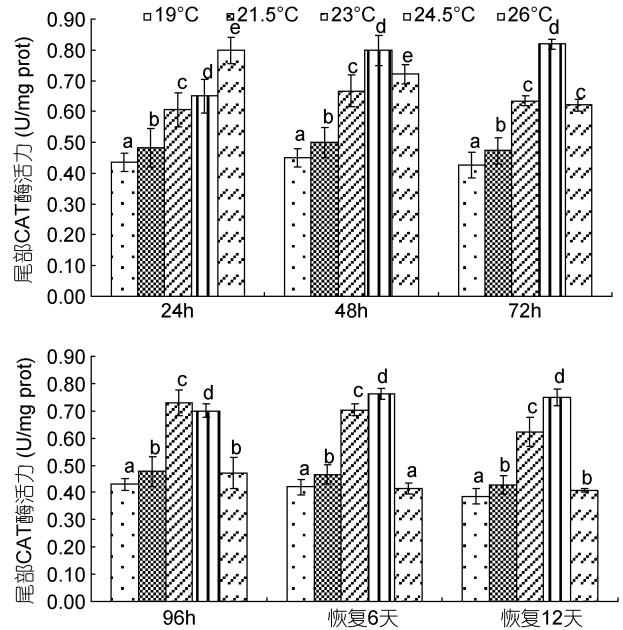


图4 不同温度条件下棘胸蛙蝌蚪尾部 CAT 酶活力的变化
Fig.4 The CAT activity in *P. spinosa* tadpole tail in different water temperature

由图 5 可见, 蝌蚪肝脏 CAT 酶活力在水温胁迫及恢复条件下的变化特征主要表现为: (1) 水温胁迫阶段, 对照组和 21.5°C 实验组各观测时点的酶活力均显著小于其它实验组别($P < 0.05$), 24h、48h 酶活力均以 26°C 实验组为最大, 72h 以 24.5°C 实验组为最大, 而 23°C 实验组、24.5°C 实验组、26°C 实验组的 96h 酶活力则均无组间差异($P > 0.05$), 即 23—24.5°C 为蝌蚪肝脏 CAT 酶耐受水温胁迫的适宜范围; (2) 水温恢复阶段, 蝌蚪肝脏 CAT 酶活力随恢复前实验水温的升高均保持以 26°C 实验组为最小($P < 0.05$), 21.5°C 实验组和对照组持平($P > 0.05$)的先升后降趋势, 其中恢复 6d 时的酶活力以 24.5°C 实验组为最大($P < 0.05$),

恢复 12d 时的 24.5°C 实验组酶活力则与 23°C 实验组无显著差异($P>0.05$), 即 24.5°C 为蝌蚪肝脏 CAT 酶耐受温降胁迫的最适水温, 而 26°C 则为温降胁迫下肝脏 CAT 酶表露轻度受损的高温临界。综上可知, 蝌蚪尾部皮肤和肝脏表露 CAT 酶活力的最适水温分别为 23°C 和 24.5°C。

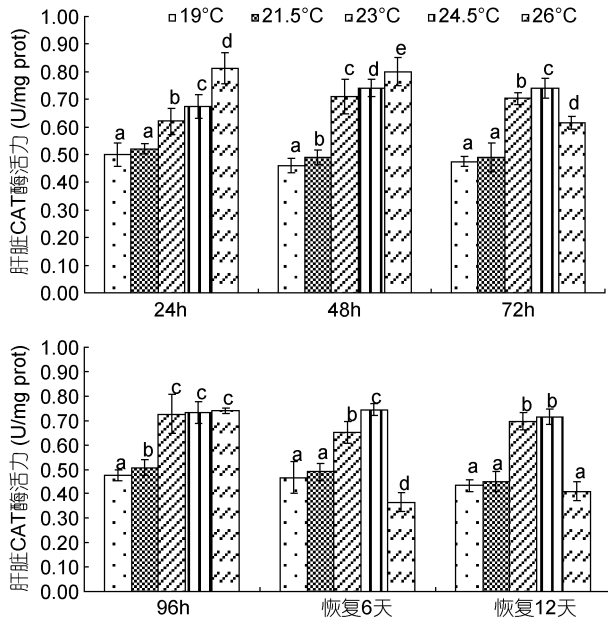


图 5 不同温度条件下棘胸蛙蝌蚪肝脏 CAT 酶活力的变化
Fig.5 The CAT activity in *P. spinosa* tadpole liver in different water temperatures

2.6 GSH 酶

由图 6 可见, 蝌蚪肝脏 GSH 酶活力在水温胁迫及恢复条件下的变化特征主要表现为: (1) 水温胁迫阶段, 随实验水温升高, 24h 肝脏 GSH 酶活力呈单调上升趋势($P<0.05$), 23°C 实验组、24.5°C 实验组、26°C 实验组于 48h 持平($P>0.05$), 72h 和 96h 均呈以 24.5°C 实验组为最大($P<0.05$)的先升后降趋势, 对照组除 96h 酶活力与 26°C 实验组持平($P>0.05$)外, 其余观测时点均显著小于其它实验组($P<0.05$); (2) 水温恢复阶段, 蝌蚪肝脏 GSH 酶活力随恢复前实验水温的升高均保持以 26°C 实验组为最小($P<0.05$)和 24.5°C 实验组为最大($P<0.05$)的先升后降趋势。综上可知, 24.5°C 为蝌蚪肝脏表露 GSH 酶活力的最适水温, 而 26°C 则为肝脏 GSH 酶活力表露受损的高温临界。

3 讨论

3.1 水温胁迫下棘胸蛙蝌蚪尾部的行为调节

变温动物往往采取行为和生理调节来响应外界温变, 以尽量使其机体维持于相对适合的生存状态

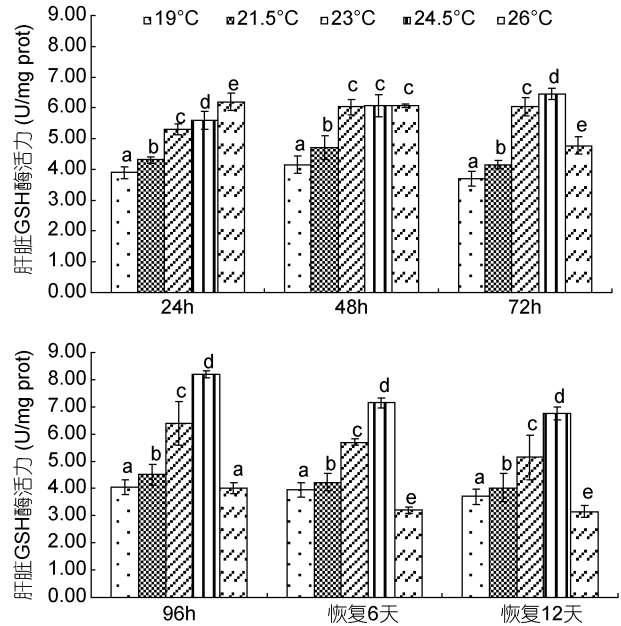


图 6 不同温度条件下棘胸蛙蝌蚪肝脏 GSH 酶活力的变化
Fig.6 The GSH activity in *P. spinosa* tadpole liver in different water temperatures

(Chen *et al*, 2011; Zhang *et al*, 2015)。尽管上述调节作用均极为有限, 但仍需为此付出相应的代价。观察发现, 仿生态条件下饲养的棘胸蛙蝌蚪在入秋前常具聚群活动的生活习性(陈文豪, 2004), 实验环境条件下棘胸蛙蝌蚪于水温 25—28°C 时便减少或停止摄食, 浮于水面并伴随着气泡病的发生(胡石柳等, 1989)。无疑, 本研究中 14°C 实验组蝌蚪分散静止于实验容器底部, 26°C 实验组蝌蚪集群分布于水表层, 以及 30°C 实验组蝌蚪散游于水表面的情形(表 1), 实际上就是蝌蚪针对水温胁迫而采取的行为调节, 其中分布水层的温度性移栖(thermal migration)和固有集群行为的丧失则是其所付代价的宏观表现。故, 分布水层和集群行为的保持与否是判别棘胸蛙蝌蚪是否处于适宜水温的重要依据。

皮肤系动物首先感知外界温度变化的器官。蝌蚪约 60% 的氧靠皮肤吸收, 其中尾部皮肤因薄且布有大量毛细血管而具重要的呼吸功能(Burggren *et al*, 1982); 解剖观察也发现, 生活于含氧量较低水域中的蝌蚪会表露出皮肤变薄、毛细血管增多并产生水—血屏障的变化特征(Burggren *et al*, 1983; Jia *et al*, 1997), 故其尾部肤色对外界环境温度胁迫做出的供氧反应也就最为直观。本研究中, 26°C 和 30°C 两实验组尾部肤色 L 值均显著大于其它实验组($P<0.05$)的结果(表 2), 与两者蝌蚪移动率均明显大于其它实验组且均分布于水表面的现象(表 1)相呼应, 既客观反

映了高温胁迫下蝌蚪尾部的行为调节机制,即:随水温的升高,蝌蚪尾部的运动节律随之加快,机体需氧压力也随之增大,从而驱使蝌蚪分布水层上移以进一步增加皮肤对氧的吸收量,并导致其尾部肤色因皮肤变薄和毛细血管的增多而显著变亮,也揭示了机体需氧压力的持续增加是导致棘胸蛙蝌蚪对高温胁迫更具敏感性的根本原因。无疑,棘胸蛙主布于我国南方丘陵海拔 500—600m 溪流区的调查结果(林光华等, 1990)所示的环境水温和水域含氧特征,也从侧面印证了上述分析的可靠性。综上可知,26°C 和 14°C 分别为棘胸蛙尾部启动行为调节的水温上、下限阈值。

3.2 水温胁迫及恢复条件下棘胸蛙蝌蚪尾部的生理调节

ATP 酶具催化 ATP 水解产生 ADP 和无机磷酸并释放自由能的作用(Häsler *et al.*, 1998),与机体能量代谢有着极为密切的关系,脏器供能压力过大势必会导致其 ATP 酶活力的受抑。SOD 和 CAT 系水生动物表露氧化应激机制中的标志酶(高晓莉等, 2004; Francesco *et al.*, 2011),在保护细胞免受氧化损伤和维持机体内氧自由基代谢平衡上具重要作用(Palacea *et al.*, 1998; 高蓉等, 2009),酶活力的高企往往预示着机体消除活性氧自由基压力的提高(Andersen *et al.*, 1998; Ross *et al.*, 2001),而酶活力的受抑则表明着机体已受到一定程度的氧化伤害(Winston *et al.*, 1991)。

本研究水温胁迫阶段,蝌蚪尾部皮肤各观测时点 ATP 酶活力随实验水温的提高均呈以 24.5°C 实验组为最大($P<0.05$)的先升后降趋势,表露 SOD 和 CAT 酶活力最大值的实验水温均随实验时间的推移而逐渐下降,并最终均以 23°C 实验组为最大($P<0.05$)的结果(图 1, 图 2, 图 4),表明 23°C 为棘胸蛙蝌蚪尾部生理活动的最适水温,这既与陶志英等(2015) 研究所述 23°C 为最利于其快速生长的培育水温的结果完全吻合,也与陈雯等(2010)观察发现 23°C 为蝌蚪孵化率达 80%以上的培育水温高限相一致。与此同时,上述测定结果与 26°C 实验组蝌蚪分布水层、个体移动率、尾部肤色 L 值均发生显著改变的情形(表 1, 表 2)相呼应,既客观反映了蝌蚪尾部对高温胁迫所具生理调节的局限性,即:适宜的培育水温可激活并促进蝌蚪尾部的 ATP、SOD 和 CAT 酶活力的显著提高,但培育水温过高不仅会抑制尾部皮肤 ATP 酶活力的进一步提高,而且还会导致尾部皮肤因活性氧自由基存量的不断累积而表露 SOD 和 CAT 酶活力的时序性受抑,也由此揭示了高温胁迫下机体需氧压力的持

续增加是导致蝌蚪尾部皮肤抗氧化酶较 ATP 酶更具敏感性的根本原因。张克烽等(2007)指出 SOD 在清除活性氧过程中最早发挥作用。故,本研究水温恢复 12d 时,各实验组尾部皮肤 ATP、SOD 和 CAT 酶活力均显著大于或等于对照组, SOD 酶活力以 23°C 实验组与对照组最为接近, 23°C 实验组 ATP 酶活力与 21.5°C 实验组、24°C 实验组均无显著差异($P<0.05$),以及 23°C 实验组 CAT 酶活力仅低于 24.5°C 实验组($P<0.05$)的结果(图 1, 图 2, 图 4),在进一步印证 23°C 为蝌蚪尾部生理活动最适水温的基础上,也揭示了尾部皮肤 SOD 在表征棘胸蛙蝌蚪适温性上所具的生理重要性,即 SOD 酶活力系蝌蚪尾部对水温胁迫启动行为调节的重要生理基础。

3.3 肝脏抗氧化酶对水温胁迫及恢复的响应特征

在正常生理状况下,抗氧化酶系统可有效清除活性氧,以保护机体免受氧化损伤。肝脏作为脊椎动物新陈代谢和氧气消耗的主要器官,往往具较高的抗氧化酶活力(Otto *et al.*, 1996),其 SOD 为最能代表机体抗氧化防御变化特征的指标酶(Wilhelm-Filho *et al.*, 1993)。无疑,本研究中各观测时点棘胸蛙蝌蚪肝脏与尾部皮肤的 SOD 酶活力变动区间均较为接近,表露肝脏 SOD 酶活力最大值和尾部皮肤 SOD 酶活力最小值的实验组别均为对照组($P<0.05$),以及胁迫结束时点肝脏 SOD 酶活力呈 26°C 实验组 $<$ 23°C 实验组 $<$ 24.5°C 实验组 $<$ 21.5°C 实验组($P<0.05$),和尾部皮肤 SOD 酶活力呈以 23°C 实验组为最大($P<0.05$)的先升后降趋势的结果(图 2, 图 3),均表明 SOD 酶活力与其机体呼吸代谢水平的高低和皮肤供氧压力的增减均有着极为密切关系,即适度偏离最适水温 23°C 不仅会导致肝脏 SOD 酶活力的显著高企,而且也会导致其尾部皮肤 SOD 酶活力的显著下降,上述情形既印证了棘胸蛙蝌蚪皮肤具较强的氧吸收能力(Burggren *et al.*, 1982; Burggren *et al.*, 1983; Jia *et al.*, 1997)的观点,也客观反映了肝脏和尾部皮肤 SOD 酶在表征棘胸蛙蝌蚪最适水温上所具的同等生理重要性。

CAT 和 GSH 均系抗氧化系统的重要成员。其中, CAT 可将 H_2O_2 还原为 H_2O 和 O_2 ,以维持细胞和机体的正常生理活动(Parihar *et al.*, 1997),GSH 可通过间接还原过氧化物或直接消除羟自由基来减少细胞氧化受损(Noctor *et al.*, 1998; Seo *et al.*, 2006)。本研究中,水温胁迫结束时点 26°C 实验组的肝脏 GSH 酶活力与对照组持平($P>0.05$),而肝脏和尾部皮肤 CAT 酶活力则均显著大于对照组($P<0.05$),水温恢复结束时

点 26°C 实验组的肝脏 GSH 酶活力显著小于对照组 ($P < 0.05$), 而肝脏和尾部皮肤 CAT 酶活力则分别大于和等于对照组的结果(图 4, 图 5, 图 6), 与水温胁迫阶段 26°C 实验组肝脏 SOD 酶活力显著小于 23°C 实验组 ($P < 0.05$), 而尾部皮肤 SOD 酶活力显著大于对照组 ($P < 0.05$) 的情形(图 2, 图 3)相呼应, 既揭示了 GSH 在表征棘胸蛙肝脏抗氧化能力上较 CAT 更具灵敏性的特质, 即保持细胞中高度稳定的 GSH 含量可提高细胞抗氧化能力(Noctor *et al.*, 1998; Lima *et al.*, 2007), 也进一步印证了 Wilhelm-Filho 等(1993)指出的肝脏 SOD 为最能代表机体抗氧化防御变化特征的指标酶的可靠性。

参 考 文 献

- 王爱民, 刘文斌, 郭文汉等, 2002. 棘胸蛙越冬试验初步研究. 水利渔业, 22(1): 3—4
- 中华人民共和国农业部, 2001. NY 5051-2001 无公害食品 淡水养殖用水水质. 北京: 中国标准出版社, 1—5
- 刘元楷, 苏向阳, 李荣招等, 1990. 棘胸蛙人工繁殖的研究. 福建水产, (3): 19—27
- 杨伟国, 周道三, 林溪平等, 1990. 棘胸蛙的生态习性与人工养殖方法. 生物学杂志, 4: 19—23
- 肖调义, 赵玉蓉, 章怀云等, 2004. 人工饲养棘胸蛙蝌蚪变态发育的研究. 水利渔业 24(1): 19—20
- 张克烽, 张子平, 陈芸等, 2007. 动物抗氧化系统中主要抗氧化酶基因的研究进展. 动物学杂志, 42(2): 153—160
- 陈平, 郑荣泉, 黄华等, 2012. 棘胸蛙求偶声与温度有关但与体大小无关. 四川动物, 31(4): 513—517
- 陈雯, 俞宝根, 郑荣泉等, 2010. 温度对棘胸蛙胚胎发育及蝌蚪表型特征的影响. 贵州农业科学, 38(1): 108—110
- 陈文豪, 2004. 棘胸蛙的人工驯养繁育研究. 安徽林业科技, (3): 10—12
- 林光华, 虞鹏程, 1990. 棘胸蛙的繁殖生物学研究. 江西大学学报(自然科学版), 14(4): 64—70
- 赵蒙蒙, 郑荣泉, 宋婷婷等, 2014. 饲料营养水平和温度对棘胸蛙蝌蚪变态发育的影响. 广东农业科学, (20): 119—120
- 胡石柳, 1991. 棘胸蛙人工饲养环境条件的研究. 福建水产, (3): 10—14
- 胡石柳, 江福来, 蔡葆青, 1989. 棘胸蛙的人工催产、卵子孵化及蝌蚪培育环境条件的初步研究. 厦门水产学院学报, 11(1): 22—27
- 耿宝荣, 张秋金, 邓媛霞等, 2004. 饲养雄性棘胸蛙生理常数及精巢的年周期变化. 应用与环境生物学报, 10(4): 451—455
- 高蓉, 张守刚, 肖杭, 2009. 脱氧鬼臼毒素对斑马鱼 (*Danio rerio*) 代谢酶和抗氧化酶活性的影响. 生态毒理学报, 4(5): 700—704
- 高晓莉, 罗胡英, 赵彦珍等, 2004. 铜、锌对鲤鱼抗氧化酶影响的研究. 淡水渔业, 34(4): 22—23
- 陶志英, 马保新, 余智杰等, 2015. 环境因子对棘胸蛙蝌蚪生长发育的影响. 湖南农业科学, 45(2): 55—56
- Andersen F, Lygren B, Maage A *et al.*, 1998. Interaction between two dietary levels of iron and two forms of ascorbic acid and the effect on growth, antioxidant status and some non-specific immune parameters in Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts. Aquaculture, 161: 437—451
- Burggren W W, West N H, 1982. Changing respiratory importance of gills, lungs and skin during metamorphosis in the bullfrog *Rana catesbeiana*. Respiratory Physiology, 47(2): 151—164
- Burggren W, Mwalukoma A, 1983. Respiration during chronic hypoxia and hyperoxia in larval and adult bullfrogs (*Rana catesbeiana*) I. Morphological responses of lungs, skin, and gills. Journal of Experimental Biology, 105(1): 191—203
- Chen C P, Hwang R L, Chang S Y *et al.*, 2011. Effects of temperature steps on human skin physiology and thermal sensation response, Building and Environment, 46(11): 2387—2397
- Francesco R, Maria E G, Maura B *et al.*, 2011. Molecular and biochemical biomarkers in environmental monitoring: A comparison of biotransformation and antioxidant defense systems in multiple tissues. Aquatic Toxicology, 105 (3—4): 56—66
- Häsler K, Engelbrecht S, Junge W, 1998. Three-stepped rotation of subunits gamma and epsilon in single molecules of F-ATPase as revealed by polarized, confocal fluorometry. Febs Letters, 1998, 426(3): 301—304
- Jia X X, Burggren W W, 1997. Development Changes in chemoreceptive control of gill ventilation in larval bullfrog (*Rana catesbeiana*) I. Reflex ventilatory responses to ambient hyperoxia, hypoxia and NaCN. Journal of Experimental Biology, 200(16): 2229—2236
- Lima I, Moreira S M, Osten J R V *et al.*, 2007. Biochemical responses of the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* to petrochemical environmental contamination along the North-western coast of Portugal, Chemosphere, 66: 1230—1242
- Noctor G, Foyer C H, 1998. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 49: 249—279
- Otto D M E, Moon T W, 1996. Endogenous antioxidant systems of two teleost fish. the rainbow trout and the black bullhead, and the effect of age. Fish Physiol Biochem, 15(4): 349—358
- Palacea V P, Brown S B, Baron C L *et al.*, 1998. An evaluation of the relationships among oxidative stress, antioxidant vitamins and early mortality syndrome (EMS) of lake trout (*Salvelinus namaycush*) from Lake Ontario. Aquatic Toxicology, 43(2—3): 195—208
- Parihar M S, Javeri T, Hemnai T *et al.*, 1997. Response of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and reduced glutathione antioxidant defenses in gills of the freshwater catfish (*Heteropneustes fossilis*) to short term elevated temperature. Journal of Thermal Biology, 22(2): 151—156
- Ross S W, Dalton D A, Kramer S *et al.*, 2001. Physiological (antioxidant) responses of estuarine fishes to variability in dissolved oxygen. Comparative Biochemistry and Physiology

- Part C: Toxicology & Pharmacology, 130: 289—303
- Seo J S, Lee K W, Rhee J S *et al*, 2006. Environmental stressors (salinity, heavy metals, H₂O₂) modulate expression of glutathione reductase (GR) gene from the intertidal copepod *Tigriopus japonicus*. *Aquatic Toxicology*, 80: 281—289
- Wilhelm-Filho D W, Giulivi C, Boveris A, 1993. Antioxidant defenses in marine fish I: Teleosts. *Comp Biochem Physiol*, 106C: 409—413
- Winston G W, Di Giulio R T, 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology*, 19: 137—161
- Zhang H Z, Zou Y J, Sun Y J *et al*, 2015. A novel thermal-insulating film incorporating microencapsulated phase-change materials for temperature regulation and nano-TiO₂ for UV-blocking. *Solar Energy Materials & Solar Cells*, 137: 210—218

IMPACT OF WATER TEMPERATURE ON *PAA SPINOSA* TADPOLE BEHAVIOR AND ENZYME ACTIVITY IN TAIL SKIN AND LIVER

ZHU Wei-Dong^{1,2}, REN Shu-Yi¹, SHENTU Yan², ZOU Li-Chang³, WANG Zhi-Zheng¹

(1. Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China; 2. Fishery Technology Extension Center of Yuyao, Yuyao 315400, China; 3. Forestry and Water Conservancy Bureau of Ningbo Jiangbei, Ningbo 315020, China)

Abstract We studied water temperature influence on *Paa spinosa* tadpoles. One-month tadpoles [body length (1.694±0.121)cm, body weight (0.548±0.062)g] were sampled and tested under 19 (control group), 21.5, 23, 24.5 and 26°C, under which the tadpole behavior was monitored and tail skin appearance in chromatic aberration observed in Hunter *L*, *A*, *B* color value. We studied the variations in the activities of ATP enzyme, antioxidant enzyme on tail skin, and antioxidant enzyme on liver and set time lengths for temperature stress at 96h and recovery at 12d. The results show that water temperature affected significantly the water zonation, and animal flocking and individual movement. The critical water temperatures in which water zonation formed and individual movement significantly changed were 14°C and 26°C. The *L* value could be used to indicate color change on the tail skin; and it remarkably changed at 26°C, the critical high temperature. The tolerable temperature for ATP enzyme activity on tail skin ranged 21.5—24.5°C. The optimum water temperature for SOD enzyme activity in tail skin and liver was 23°C, while 23°C and 24.5°C for CAT enzyme activity. In addition, when water temperature reached 26°C, SOD enzyme activity in liver decreased with obvious damage in the liver. The optimum water temperature for GSH enzyme activity in liver was 24.5°C, and the critical temperature was 26°C.

Key words water temperature; *Paa spinosa* tadpole; behavior; chromatic aberration; tail; liver; ATP enzyme; antioxidant enzyme