



振荡频率对曼氏无针乌贼成体死亡率及生存状态的影响

周珊珊^{1,2}, 周永东^{1,2}, 李哲^{1,2}, 欧阳洪¹, 镇小蔓¹,
梁君^{1,2}, 陈俊琳³, 陈佳怡¹, 徐开达^{1,2*}

(1. 浙江省海洋水产研究所, 浙江 舟山 316000;

2. 浙江省海洋渔业资源可持续利用技术研究重点实验室, 浙江 舟山 316000;

3. 浙江省普陀区海洋与渔业局, 浙江 舟山 316100)

摘要: 为提高曼氏无针乌贼增殖放流运输过程的存活率, 在实验室条件下研究了 0、60、100、120、140 和 160 r/min 振荡频率对成体曼氏无针乌贼死亡率、乳酸、糖原含量及酶活性的影响。结果显示, 除 160 r/min 死亡率略有下降外, 其他组随着频率的增高死亡率升高, 频率 120、140 r/min 时死亡率最高为 91.7%, 显著高于 0、60、100 r/min 处理组。死亡时间主要分布在振荡后的 4~8 h, 频率越低乌贼出现死亡的时间越晚, 160 r/min 率先在 2 h 出现死亡个体。除个别组出现波动外, 随着频率的增大, 两种组织(肌肉、肝脏)的糖原含量降低, 而乳酸含量增大, 140 r/min 处理组糖原、乳酸含量与对照组间差异显著。除 60 r/min 处理组外, 随着频率的增加, 肝脏组织中的谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (GOT) 活性降低, 超氧化物歧化酶 (SOD) 活性增加, 且 120、140、160 r/min 处理组 3 种酶活性与其他组间差异显著。碱性磷酸酶 (ALP) 活性随着频率的增加而升高, 140 和 160 r/min 处理组与其他组间差异显著。乌贼死亡率与 SOD、肌肉乳酸含量、ALP 之间极显著正相关, 与肌肉糖原含量、GOT 和 ALT 活性、消化腺糖原含量之间极显著负相关。研究表明, 频率显著影响乌贼的存活率, 能量耗尽和肝脏损伤可能是乌贼运输过程高死亡率的主要原因, 运输过程建议振荡频率小于 100 r/min 且运输时间小于 3 h, 尽量避免较大程度的晃动。本研究可为曼氏无针乌贼成体的增殖放流运输过程提供技术支撑。

关键词: 曼氏无针乌贼; 振荡频率; 喷墨; 死亡率; 糖原; 乳酸

中图分类号: S 981.9

文献标志码: A

曼氏无针乌贼 (*Sepiella japonica*) 属软体动物门 (Mollusca) 头足纲 (Cephalopoda) 十腕总目 (Decapodiformes) 乌贼目 (Sepioidea) 乌贼科 (Sepiidae), 俗称墨鱼, 属于中型乌贼, 曾是我国“四大海产”之一, 在我国浙江和福建沿海较为集中。过度捕捞和生境破坏等致使乌贼资源受到严重破坏, 产量连续下降, 曼氏无针乌贼已经无法

形成渔汛, 因此相关部门开展了一系列的增殖放流工作^[1-4]。目前, 曼氏无针乌贼增殖放流主要通过放流乌贼受精卵的方式开展, 附着的乌贼卵易被海水冲散或因环境因素而不能完全孵化, 孵化率低, 放流幼体和怀卵亲体的方式可以提高乌贼卵的孵化率和幼体存活率^[3, 5-8]。然而, 乌贼在运输过程中对外界刺激十分敏感, 运输晃动容易使

收稿日期: 2021-06-25 修回日期: 2022-04-12

资助项目: 国家重点研发计划 (2019YFD0901204, 2019YFD0901205, 2020YFD0900804); 浙江省重点研发项目 (2019C02056)

第一作者: 周珊珊 (照片), 从事海洋生态修复研究, E-mail: 474596507@qq.com

通信作者: 徐开达, 从事渔业资源与海洋生态修复研究, E-mail: xkd1981@163.com



其喷墨而大量死亡, 成为制约增殖放流、苗种繁育等过程的关键因素^[9-10]。

运输过程中会发生水流的振荡, 振荡程度可以通过振荡频率来量化^[11-13]。振荡频率影响黑棘鲷 (*Acanthopagrus schlegelii*) 幼鱼、大口黑鲈 (*Microporus salmoides*)、石斑鱼、鲫 (*Carassius auratus*) 等鱼类的死亡率, 且对乳酸、糖原、酶活性等具有显著影响, 乳酸、糖原、酶活性等生理生化指标是反映机体能量代谢和应激情况的重要指标^[11-14]。且谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (GOT)、碱性磷酸酶 (ALP)、超氧化物歧化酶 (SOD) 活性与硫化物、亚硝酸氮对曼氏无针乌贼的胁迫损伤密切相关^[15-16]。目前, 国内外学者的研究主要集中在乌贼生态学^[17-18]、人工繁育^[19-21]、生长发育^[22-24]、资源分布^[25]、分子生物学^[26-27]等方面, 但仍缺乏运输过程中振荡频率对曼氏无针乌贼死亡率及生存状态影响的相关研究。因此, 本研究选用乳酸、糖原及 ALT、GOT、ALP、SOD 的活性为指标开展了振荡频率对乌贼死亡及机体影响的研究, 查明了振荡频率对乌贼成体死亡及生存状态的影响, 推测高频率下曼氏无针乌贼成体的死亡原因, 量化乌贼对振荡频率所产生的应激程度, 为曼氏无针乌贼成体的增殖放流运输过程提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 实验材料及驯化

实验所用曼氏无针乌贼为成体, 取自浙江省舟山市西轩养殖试验场中间培育的乌贼, 胴背长为 (6.5 ± 0.3) cm, 体重为 (2.8 ± 0.4) g, 且各频率组间无显著差异 ($P > 0.05$)。采用上海力辰仪器科技有限公司 HY-4A 调速多用振荡器 (振荡幅度 20 mm, 频率 0~300 r/min) 进行实验。实验在西轩养殖场进行, 暂养 1 周, 每天定时 6:00、17:00 投喂冰鲜饲料, 饲喂后换水, 用氧气泵不断向水中充氧, 保持水中 $DO > 5.5$ mg/L, 盐度为 30~31, pH 7.8~7.9, 光照周期为 12 L : 12 D。实验开始前 24 h 停止喂食, 然后将乌贼从暂养池中转入到相同水温的透明聚乙烯圆形水桶 (体积 5 L), 将水桶平放于模拟运输振动台上并加以固定。实验过程中操作人员严格遵守实验动物福利和动物实验伦理规范, 并按照浙江海洋水产研究所实验动物管理及动物福利伦理委员会制定的规章制度执行。

1.2 实验方法

参考相关文献^[11-14], 并根据预实验结果, 去

除短时间内可能会导致乌贼高死亡率, 无法进行实际运输操作的较大频率。共设 6 个处理组, 振荡频率分别为 0、60、100、120、140、160 r/min, 每个振荡设 3 个平行。实验持续 12 h, 各组水温均为 23 °C, 保持 $DO > 5.5$ mg/L, 海水盐度、pH 同暂养池, 实验过程不投饵。每个透明聚乙烯圆形水桶内盛放 2.5 L 海水, 放入 4 只乌贼。

实验过程中观察到乌贼浮于表面, 鳍的摆动停止, 触碰无反应即判定为死亡, 记录对应时间, 并捞出取样。当乌贼较虚弱的情况下, 会出现喷墨情况, 为避免喷墨产生的干扰, 喷墨后轻柔换水。每组实验在该组全部样品死亡后结束, 若该组样品未全部死亡则在实验进行 12 h 后终止。乌贼经丁香酚快速麻醉后, 测量体长和体重, 随后置于冰上快速取其腹部肌肉、肝脏样品, 保存于 -80 °C 中待测。采用南京建成生物工程研究所的试剂盒测定肝脏组织中的乳酸和糖元含量以及各酶的活性。

1.3 数据分析

数据的统计和分析采用 SPSS 17.0 软件进行, 并以平均值±标准误 (mean±SE) 表示, 采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 对乌贼胴背长、死亡率、糖原和乳酸含量、酶活性等数据进行差异分析, 以 $P < 0.05$ 作为差异显著标准。乌贼死亡率与生理指标间采用 Spearman 相关性分析, 以 $P < 0.05$ 作为显著相关标准, 以 $P < 0.01$ 作为差异极显著标准。同时, 利用 MINE 算法分析各指标与死亡率间的相关性。

2 结果

2.1 不同振荡频率下曼氏无针乌贼的喷墨行为及死亡率

曼氏无针乌贼对振荡产生了一系列的适应性行为, 低频率处理组乌贼静止匍匐于水槽底部, 游动频率减少。高频率处理组 (120、140、160 r/min), 部分乌贼静止匍匐于底部, 部分乌贼会利用触腕, 缠绕于气石水管上或贴于玻璃槽壁上 (图版)。当乌贼较虚弱, 无法控制墨囊肌肉时, 会出现多次喷墨的情况, 之后浮于水体表面, 处于虚弱假死的状态, 一段时间后死亡。

曼氏无针乌贼死亡时间主要出现在振荡 4~8 h, 频率越低出现死亡的时间越晚。高频率 160 r/min 在 2 h 时即出现死亡。对照组无死亡个体。60、100、120、140、160 共 5 个处理组, 在 0~3



图版 振荡情况下曼氏无针乌贼的行为过程

1. 静止于水槽底部, 2. 触腕吸附于水槽底部(箭头), 3. 触腕缠绕于塑料管(箭头), 4. 触腕缠绕于塑料管(腹面观, 箭头)。

Plate Behavior of *S. japonica* at different oscillation frequencies

1. stationary at the bottom of the tank, 2. the tentacles adsorb to the bottom of the tank (arrow), 3. the tentacles wound around the pipe (arrow), 4. the tentacles wound around the pipe (ventral aspect, arrow).

的乌贼死亡数合计为 4 只, 3~6 h 死亡数合计为 13 只, 6~9 h 死亡数合计为 10 只, 9~12 h 死亡个数合计为 6 只(图 1)。曼氏无针乌贼不宜长时间运输, 振荡频率为 60 r/min 的运输时间不宜超过 6 h, 振荡频率为 100 r/min 的运输时间不宜超过 3 h。

除 160 r/min 处理组外, 随着频率增大, 曼氏无针乌贼死亡率逐渐升高, 频率 120 r/min、140 r/min 时死亡率最高, 为 91.7%, 显著高于 0、60 和 100 r/min 处理组 ($P<0.05$)(图 2)。

2.2 不同振荡频率下曼氏无针乌贼糖原和乳酸含量变化

频率影响曼氏无针乌贼肌肉和消化腺糖原含量, 不同组织糖原变化略有不同(图 3)。随着频率的增加, 肌肉糖原含量降低, 对照组糖原含量最高 (39.4 mg/g prot), 140 r/min 处理组最低 (26.0 mg/g prot), 其次为 160 r/min 处理组 (29.1 mg/g prot), 140 r/min 处理组与 0、60 和 100 r/min 间差异显著 ($P<0.05$)。除 60 r/min 处理组外, 随着频率的增加, 消化腺糖原含量降低, 60 r/min 处理组消化腺糖原含量最高 (39.4 mg/g prot), 其次为对照

组, 160 r/min 处理组糖原含量最低 (26.8 mg/g prot), 100、140 和 160 r/min 组与 0 r/min 组间差异显著 ($P<0.05$)。

频率影响曼氏无针乌贼肌肉和消化腺乳酸含量, 随着频率的增加肌肉乳酸含量升高, 对照组乳酸含量最低 (0.8 mmol/g prot), 160 r/min 处理组

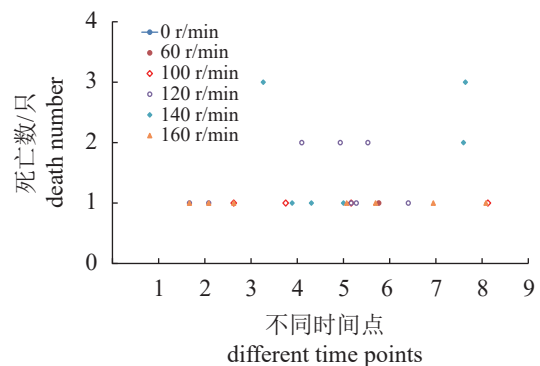


图 1 不同频率下曼氏无针乌贼的死亡时间

Fig. 1 Death time of *S. japonica* at different frequencies

1. 1 h 12 min, 2. 2 h 24 min, 3. 3 h 36 min, 4. 4 h 48 min, 5. 6 h, 6. 7 h 12 min, 7. 8 h 24 min, 8. 9 h 36 min, 9. 10 h 48 min.

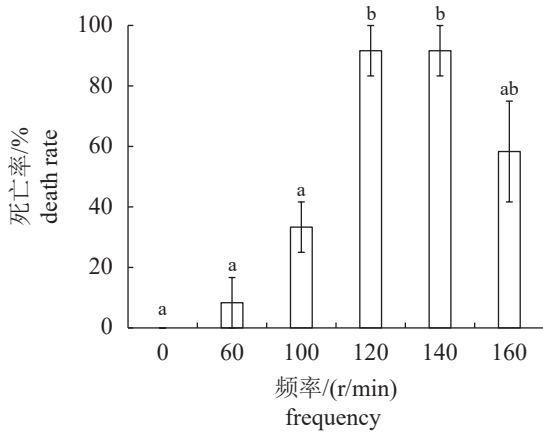


图2 不同振荡频率条件下曼氏无针乌贼的死亡率
不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 2 Death rates of *S. japonica* at different oscillation frequencies

Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

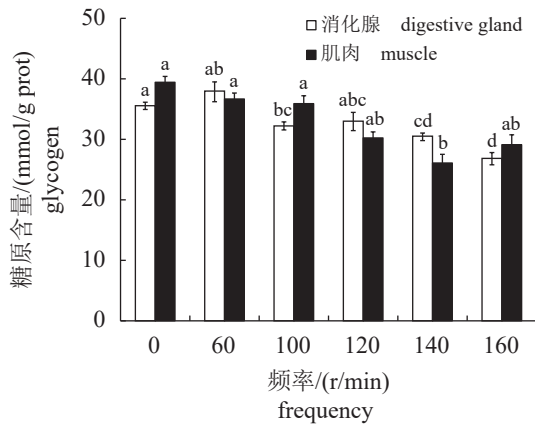


图3 不同振荡频率条件下曼氏无针乌贼的糖原含量

同一组织不同频率误差线上的不同字母表示不同振荡频率组间差异显著 ($P < 0.05$), 图4同。

Fig. 3 Glycogen content of *S. japonica* at different frequencies

Different letters above error bars indicate significant differences between different frequencies groups in same tissue ($P < 0.05$), the same as Fig.4.

最高 (1.3 mmol/g prot), 100、120、140 和 160 r/min 组与 0 r/min 组间差异显著 ($P < 0.05$)。除 60 r/min 处理组外, 随着频率的增加, 消化腺乳酸含量增加, 0 和 100 r/min 组乳酸含量最低, 为 0.9 mmol/g prot, 160 r/min 处理组糖原含量最高 (1.1 mmol/g prot), 60、160 r/min 处理组与 0 r/min 组间差异显著 ($P < 0.05$) (图4)。

2.3 不同振荡频率下曼氏无针乌贼消化腺酶活性的变化情况

除 60 r/min 处理组外, 随着频率的增加,

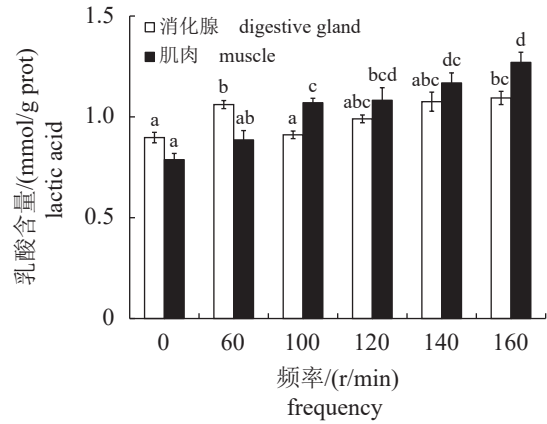


图4 不同振荡频率条件下曼氏无针乌贼的乳酸含量

Fig. 4 Lactic acid content of *S. japonica* at different frequencies

ALT 活性降低, 120、140 和 160 r/min 处理组与 0、60 和 100 r/min 处理组间差异显著 ($P < 0.05$), 60 r/min 处理组 ALT 活性最高 (3.0 U/g prot), 160 r/min 处理组 ALT 活性最低 (1.5 U/g prot) (图5)。除 60 r/min 处理组外, 随着频率的增加, GOT 活性降低, 120、140 和 160 r/min 处理组 GOT 活性与 0、60 和 100 r/min 处理组间差异显著 ($P < 0.05$)。在频率 60 r/min 下最高 (4.3 U/g prot), 其次为对照组 (3.9 U/g prot), 160 r/min 最低 (1.2 U/g prot) (图5)。

ALP 活性随着频率的增加而增加, 0 r/min 组最低 (5.6 IU/g prot), 140 r/min 组最高 (7.9 IU/g prot), 140 和 160 r/min 处理组与其他组间差异显著 ($P < 0.05$)。

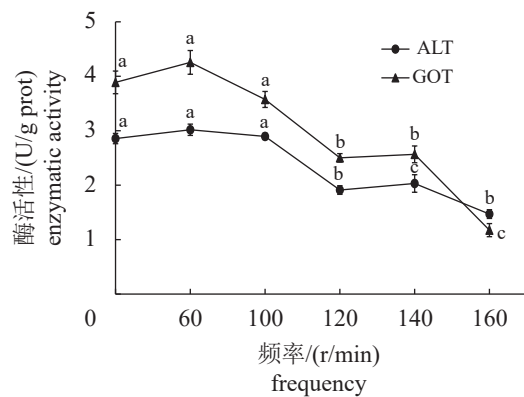


图5 不同振荡频率条件下曼氏无针乌贼的 ALT 和 GOT 活性

同一种酶不同频率误差线上的不同字母表示不同频率组间差异显著 ($P < 0.05$), 图7同。

Fig. 5 Enzymatic activity of *S. japonica* at different frequencies

Different letters above error bars indicate significant differences between different frequencies group in same enzyme activity ($P < 0.05$).

0.05)。除频率 60 r/min 处理组外, SOD 活性随着频率的增加而升高, 在频率 60 r/min 下最低 (48.9 U/mg prot), 在 140 和 160 r/min 频率最高 (66.5、66.4 U/mg prot), 且 120、140 和 160 r/min 处理组与其他组间差异显著 ($P<0.05$) (图 6)。

2.4 死亡率与生理指标相关性分析

不同振荡频率下, 死亡率与 SOD、肌肉乳酸含量、ALP 之间呈极显著正相关 ($P<0.01$), 与肌肉糖原、消化腺糖原含量、GOT 和 ALT 活性之间呈极显著负相关 ($P<0.01$) (表 1)。

不同振荡频率下死亡率与生理指标相关性较强的前 5 个生理指标依次为 GOT 活性、肌肉糖原含量、ALT 活性、肌肉乳酸含量和 SOD 活性 (表 2)。

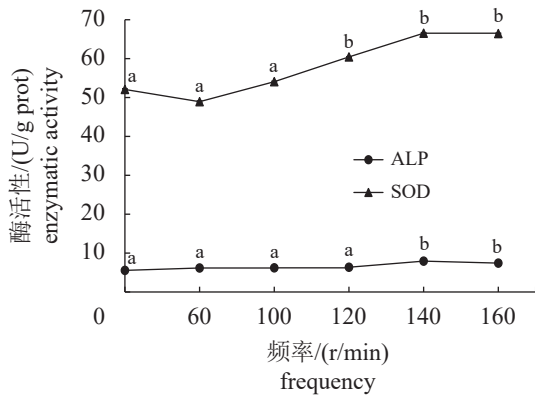


图 6 不同振荡频率条件下曼氏无针乌贼的 ALP 和 SOD 酶活性

Fig. 6 Enzymatic activity of *S. japonica* at different frequencies

表 1 死亡率与生理指标相关性分析

Tab. 1 Correlation analysis of mortality and physiological indicators

生理指标 physiological indicators	与死亡率间的相关系数 Pearson correlation analysis
消化腺糖原含量 digestive gland glycogen content	-0.483**
消化腺乳酸含量 digestive gland lactate content	0.222
肌肉糖原含量 muscle glycogen content	-0.735**
肌肉乳酸含量 muscle lactate content	0.644**
谷丙转氨酶 ALT	-0.643**
谷草转氨酶 GOT	-0.709**
碱性磷酸酶 ALP	0.513**
超氧化物歧化酶 SOD	0.671**

注: **表示极显著相关。
Notes: ** indicates extremely significant correlation.

表 2 MINE 算法分析死亡率与生理指标的关系

Tab. 2 MINE algorithm analyzing the relationship between mortality and physiological indicators

X轴 X axis	Y轴 Y axis	强度 (MIC) strength (MIC)
死亡率/% death rate	GOT活性 GOT activity	0.827 59
	肌肉糖原含量 muscle glycogen content	0.775 14
	ALT活性 ALT activity	0.755 58
	肌肉乳酸含量 muscle lactate content	0.744 86
	SOD活性 SOD activity	0.611 24
	ALP活性 ALP activity	0.418 84
	消化腺糖原含量 digestive gland glycogen content	0.380 05
	消化腺乳酸含量 digestive gland lactate content	0.374 71

3 讨论

3.1 振荡频率对曼氏无针乌贼行为及死亡率的影响

运输过程中的晃动是引起水生动物死亡的重要非生物因素, 特别是对具有喷墨属性的博克氏蛸 (*Octopus bocki*)、虎斑乌贼 (*Sepia pharaonis*) 等来说, 喷墨引发较高的死亡率^[10, 28-30]。在遇到晃动时, 曼氏无针乌贼采取静止匍匐于水槽底部的方式对抗水流, 当高频率晃动导致个体能量损耗, 机体无法平衡匍匐于底部时, 曼氏无针乌贼采取触腕缠绕于水管上或贴于玻璃槽壁上以辅助抵御水流的晃动。曼氏无针乌贼贴底匍匐和喷墨后的虚弱情况与虎斑乌贼喷墨后的情况基本一致^[29]。振荡频率显著影响曼氏无针乌贼的死亡率, 频率大于 100 r/min 时死亡率显著上升, 在 120 和 140 r/min 频率下死亡率最高, 且超过 160 r/min 频率下的死亡率, 分析是由于容器发生了共振, 增大了晃动程度。这与姜胜超^[31]对波浪作用下液舱内流体晃动的耦合数值分析研究相似, 在舱外波浪与舱内液体共振时, 舱内出现波峰变陡, 波谷变坦的非线性特征, 并在冲击顶盖后呈现出波浪翻卷及气液混合等复杂物理现象。因此, 曼氏无针乌贼在运输过程中应尽量避免过高的振荡频率, 特别是避免波峰重叠所造成的高死亡率的发生。

曼氏无针乌贼的死亡时间主要在 4~8 h, 频率越低个体出现死亡的时间越晚。黑棘鲷幼鱼在频率低于 105 r/min 振荡 24 h 的死亡率为 0, 在频率为 140 r/min 时死亡率为 50%, 175、210 r/min 时死亡率 100%^[11]。与黑棘鲷幼鱼相比, 在振荡 12 h 的情况下, 乌贼在 120、140 r/min 时死亡率已经达到 91.7%, 相对于鱼类, 其短时间内的死亡率更高。乌贼在 100 r/min、运输 12 h 的死亡率为 33.3%, 当频率上升至 120、140 r/min 时, 死亡率显著上升至 91.6%。因此认为运输过程振荡频率宜低于 100 r/min。根据运输实际, 在振荡频率大于 100 r/min 情况下运输时间不宜超过 2 h。

3.2 振荡频率对曼氏无针乌贼糖原、乳酸含量的影响

糖原主要存在于肌肉和肝脏中, 有氧代谢途径分解代谢产生葡萄糖, 而乳酸则是糖酵解途径的主要产物。随着振荡频率的增加, 曼氏无针乌贼肌肉组织糖原逐渐耗尽, 更多的供能来源于糖酵解途径, 形成了乳酸堆积。在振荡频率为 140 r/min 时糖原含量最低, 140 和 160 r/min 时乳酸含量较高, 这与大口黑鲈、黑棘鲷幼鱼、大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 等在运输振荡过程中糖原和乳酸的变化规律一致^[11-12, 32]。大口黑鲈在 3 h, 频率 130 r/min 的运输条件下, 肌肉糖原含量显著低于 0 和 60 r/min 处理组, 而乳酸含量显著高于 0、60 和 100 r/min 处理组。黑棘鲷幼鱼、大黄鱼随实验振荡频率的增加, 肌肉乳酸浓度和糖元含量分别增加和降低。本研究中 140 r/min 处理组的糖原含量最低, 与该组死亡率最高具有一致性。

乌贼的肝脏与肌肉组织中糖原和乳酸变化趋势基本一致, 但在 60 r/min 出现了糖原增加、乳酸显著升高的趋势, 说明乌贼在低频率的振荡下, 启动了糖酵解途径为机体供能, 引发了乳酸的堆积, 之后肌肉中的乳酸通过血液运输至肝脏, 在肝脏中重新合成了糖原, 从而维持机体血糖稳定。因此, 60 r/min 情况下出现了糖原含量的增加和乳酸含量的显著升高, 同时与肝脏解毒酶 (ALT、GOT) 活性小幅度的升高有一定相关性。当频率大于 60 r/min, 机体可能出现了肝脏损伤, 肝脏的乳酸代谢能力降低, 糖原的合成也相应降低。这与草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 的肝脏糖原代谢有一定差异, 脂肪蓄积对草鱼肝脏组织影响的相关研究发现, 脂肪过量蓄积会导致肝脏内葡萄糖含

量上升, 乳酸含量下降, 肝脏将乳酸合成为糖原为机体供能^[33]。

3.3 振荡频率对曼氏无针乌贼酶活性的影响

ALT 与 GOT 主要分布在肝细胞内。肝细胞发生病变或坏死时 ALT 和 GOT 浓度升高, 且升高的程度与肝细胞受损的程度相一致。当胁迫程度增强, 机体肝细胞死亡时, 酶活性显著下降^[16]。本研究中, 曼氏无针乌贼体内 ALT 和 GOT 活性在 60 r/min 振荡频率下增加, 随着频率增大, 酶活性在 120 r/min 处理组出现显著降低, 表明乌贼肝细胞先出现损伤, 后发生死亡。本研究结果与硫化物胁迫下曼氏无针乌贼 GOT 活性变化规律一致^[29]。振荡对乌贼的影响可能还包括喷墨后的微毒性作用。不同频率乌贼在振荡运输后期均发生了喷墨, 虽然及时进行了换水, 但可能仍有乌贼吸入墨而导致肝脏损伤。

软体动物不具备特异性免疫, 吞噬作用在其防御机制中具有重要作用, ALP 是其中一类重要的水解酶, 异物被吞噬后与溶酶体结合, 再被水解酶消化分解从而完成防御反应^[29]。本研究中大于 100 r/min 的振荡频率下 ALP 活性显著增加, 表明高频率振荡刺激了曼氏无针乌贼的免疫反应, 这与低浓度条件下亚硝酸氮对曼氏无针乌贼胁迫、氨氮对栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 胁迫下 ALP 的变化趋势一致^[15, 34]。高浓度亚硝酸氮、氨氮胁迫下曼氏无针乌贼和栉孔扇贝均出现了酶活性的下降, 产生机体损伤, 而本实验中高振荡频率下 ALP 酶活性未出现下降, 表明高振荡频率并没有造成乌贼严重的机体损伤。SOD 可以防止机体受到自由基的损害, 受到轻度逆境胁迫时, SOD 活性往往升高, 而受到重度逆境胁迫时, SOD 活性降低, 此时机体受到损伤^[15]。本研究中 140 和 160 r/min 的振荡频率下 SOD 活性显著升高, 说明乌贼受到轻度逆境胁迫, 以升高 SOD 活性来减少高频率对机体造成的自由基损伤。

3.4 死亡率与生理指标间的相关性

Spearman 相关性分析应用于死亡率与免疫组化指标之间的相关性^[35-36]。本研究中, 不同振荡频率下死亡率与 SOD 活性、肌肉乳酸含量、ALP 活性之间呈极显著正相关, 随着振荡频率增加, 以上各指标升高、死亡率增加, 与乌贼在亚硝酸氮、氨氮等有害物质胁迫下的防御机制相似^[15, 34]。不同振荡频率下死亡率与肌肉和消化腺糖原含量、

GOT 活性、ALT 活性之间呈极显著负相关。糖原含量越高, 死亡率越低, 与大口黑鲈、黑棘鲷幼鱼、大黄鱼等在运输振荡过程中能量消耗规律一致^[11-12, 32]。

近年来, maximal information-based nonparametric exploration (MINE) 算法为非参数变量的相关性分析提供了新策略。与其他基于特定函数的回归模型不同, MINE 算法可以检测由多个因素驱动的复杂关系, 该方法的重大优势在于其提供了在同一尺度下评价相关性的大小, 从而找到关系最强的变量对^[37-38]。MINE 算法已经广泛应用于探索生物与环境参数之间的关系, 为各类型变量关系提供了一种标准化的数据挖掘解决方案^[39-40]。本研究利用 MINE 算法, 得出不同振荡频率下死亡率与生理指标相关性较强的前 5 个生理指标, 依次为 GOT 活性、肌肉糖原含量、ALT 活性、肌肉乳酸含量和 SOD 活性, 与 Spearman 相关性分析结果一致, 且与前文已论述的硫化物、亚硝酸氮、氨氮及运输胁迫条件下的相关研究结果相一致。

综上所述, 振荡频率显著影响成体曼氏无针乌贼的存活率, 乌贼产生了一系列行为和生理反应来适应振荡产生的影响, 肌肉能量耗尽和肝脏损伤可能是乌贼在运输过程中高死亡率的主要原因。建议运输过程中避免较大程度振荡的发生, 振荡频率应低于 100 r/min 且运输时间少于 3 h。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 乌贼资源增殖研究课题组. 浙江近海曼氏无针乌贼资源增殖及繁殖保护的研究[J]. 浙江水产学院学报, 1986, 5(2): 99-104.
Squid resources propagation research group. Protection of stocks and propagation of *Sepiella maindroni* de rochebrune in Zhejiang inshore waters[J]. Journal of Zhejiang College of Fisheries, 1986, 5(2): 99-104 (in Chinese).
- [2] 董智勇. 中街山列岛曼氏无针乌贼增殖放流、产卵场修复及效果分析 [D]. 舟山: 浙江海洋学院, 2010.
Dong Z Y. Enhancement and effects analysis, and spawning grounds rehabilitation of *Sepiella maindroni* in Zhongjieshan waters[D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2010 (in Chinese).
- [3] 吴常文, 董智勇, 迟长风, 等. 曼氏无针乌贼(*Sepiella*

maindroni)繁殖习性及其产卵场修复的研究[J]. 海洋与湖沼, 2010, 41(1): 39-46.

Wu C W, Dong Z Y, Chi C F, *et al.* Reproductive and spawning habits of *Sepiella maindroni* off Zhejiang, China[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2010, 41(1): 39-46 (in Chinese).

- [4] 李继姬, 郭宝英, 吴常文. 浙江海域曼氏无针乌贼资源演变及修复路径探讨[J]. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2011, 30(5): 381-385, 396.

Li J J, Guo B Y, Wu C W. A review of the resource evolution and the way of restoration of *Sepiella maindroni* in coastal waters of Zhejiang Province[J]. Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science Edition), 2011, 30(5): 381-385, 396 (in Chinese).

- [5] 王伟定, 俞国平, 梁君, 等. 东海区适宜增殖放流种类的筛选与应用[J]. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2009, 28(4): 379-383.

Wang W D, Yu G P, Liang J, *et al.* Selection and application of suitable stock enhancement and releasing species in the East China Sea[J]. Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science Edition), 2009, 28(4): 379-383 (in Chinese).

- [6] 吴常文, 吕永林, 虞顺成. 中街山岛礁区渔业综合开发建议[J]. 海洋开发与管理, 1995, 12(1): 68-71.

Wu C W, Lü Y L, Yu S C. The ideas about the comprehensive exploitation of the fishery in the island and rock district, Zhongjieshan Islands[J]. Ocean Development and Management, 1995, 12(1): 68-71 (in Chinese).

- [7] 浙江省质量技术监督局. 海洋生物增殖放流技术规范曼氏无针乌贼: DB33/T 2107—2018 [S]. 舟山: 浙江省海洋水产研究所, 2018: 1-6.

Zhejiang Provincial Bureau of Quality and Technical Supervision. Technical regulation for stock enhancement of marine organism. Cuttlefish (*Sepiella maindroni*): DB33/T 2107-2018 [S]. Zhoushan: Zhejiang Marine Fisheries Research Institute, 2018: 1-6 (in Chinese).

- [8] 董正之, 曾呈奎, 周海鸥, 等. 中国海洋科学研究及开发 [M]. 青岛: 青岛出版社, 1992.

Dong Z Z, Zeng C K, Zhou H O, *et al.* Marine science study and its prospect in China[M]. Qingdao: Qingdao Press, 1993: 23-36 (in Chinese).

- [9] Derby C D. Cephalopod ink: production, chemistry, functions and applications[J]. *Marine Drugs*, 2014, 12(5): 2700-2730.

- [10] 浙江海洋学院. 乌贼活体运输方法及专用控墨滑槽:

- 中国, 200910154213.9[P]. 2012-07-04.
- Zhejiang Ocean University. Squid living body transportation method and special ink control chute: CN, 200910154213.9[P]. 2012-07-04 (in Chinese).
- [11] 朱越, 王凯, 吴松, 等. 水温和摇晃对黑鲷幼鱼运输生存状态的影响[J]. *上海海洋大学学报*, 2020, 29(4): 533-541.
- Zhu Y, Wang K, Wu S, *et al.* Preliminary studies on the effects of the temperature and shaking on transport and survival of juvenile black seabream (*Acanthopagrus schlegelii*)[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2020, 29(4): 533-541 (in Chinese).
- [12] 王利娟. 大口黑鲈保活运输的研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2015.
- Wang L J. Study on keep-alive transportation of large-mouth bass (*Micropterus salmoides*)[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2015 (in Chinese).
- [13] 吴波, 谢晶. 溶解氧水平和振动对有水活过程中石斑鱼氧化应激的影响[J]. *食品与机械*, 2019, 35(8): 137-142,182.
- Wu B, Xie J. Effects of the dissolved oxygen level and the vibration on oxidative stress of grouper during water transport[J]. *Food & Machinery*, 2019, 35(8): 137-142,182 (in Chinese).
- [14] 王文博, 汪建国, 李爱华, 等. 振荡胁迫后鲫血液皮质醇和溶菌酶水平的变化[J]. *水生生物学报*, 2004, 28(6): 682-684.
- Wang B W, Wang J G, Li A H, *et al.* Changes of cortisol and lysozyme levels in *Carassius auratus* blood after handling stress[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, 28(6): 682-684 (in Chinese).
- [15] 樊甄姣, 夏灵敏, 吴常文, 等. 亚硝酸氮对曼氏无针乌贼幼体的急性毒性及免疫系统的影响[J]. *河北渔业*, 2009(7): 8-11.
- Fan Z J, Xia L M, Wu C W, *et al.* The acute toxicity of NO₂-N on *Sepiella maindroni* juvenile and effects of NO₂-N on enzyme activity[J]. *Hebei Fisheries*, 2009(7): 8-11 (in Chinese).
- [16] 尹飞, 彭士明, 范帆, 等. 硫化物急性毒性对曼氏无针乌贼幼体血液生理生化指标的影响[J]. *安全与环境学报*, 2011, 11(4): 9-13.
- Yin F, Peng S M, Fan F, *et al.* Acute toxic physiological and biochemical impacts of sulfide on the blood of juvenile *Sepiella maindroni*[J]. *Journal of Safety and Environment*, 2011, 11(4): 9-13 (in Chinese).
- [17] 王萍, 吴常文, 童懿宏. 光照对曼氏无针乌贼行为习性的影响[J]. *河北渔业*, 2009(11): 3-6.
- Wang P, Wu C W, Tong Y H. Studies on the habits of *Sepiella maindroni* de Rochebruns under illumination conditions[J]. *Hebei Fisheries*, 2009(11): 3-6 (in Chinese).
- [18] Wang J J, Pierce G J, Boyle P R, *et al.* Spatial and temporal patterns of cuttlefish (*Sepia officinalis*) abundance and environmental influences—a case study using trawl fishery data in French Atlantic coastal, English Channel, and adjacent waters[J]. *ICES Journal of Marine Science*, 2003, 60(5): 1149-1158.
- [19] Correia M, Domingues P M, Sykes A, *et al.* Effects of culture density on growth and broodstock management of the cuttlefish, *Sepia officinalis* (Linnaeus, 1758)[J]. *Aquaculture*, 2005, 245(1-4): 163-173.
- [20] Molschanivskyj N A, Jackson G D. Growth and tissue composition as a function of feeding history in juvenile cephalopods[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2000, 253(2): 229-241.
- [21] 蒋霞敏, 符方尧, 李正, 等. 曼氏无针乌贼的卵子发生及卵巢发育[J]. *水产学报*, 2007, 31(5): 607-617.
- Jiang X M, Fu F Y, Li Z, *et al.* Study on the oogenesis and ovarian development of *Sepiella maindroni*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2007, 31(5): 607-617 (in Chinese).
- [22] Koueta N, Boucaud-Camou E, Noel B. Effect of enriched natural diet on survival and growth of juvenile cuttlefish *Sepia officinalis* L.[J]. *Aquaculture*, 2002, 203(3-4): 293-310.
- [23] 张宝琳, 孙道无, 毕洪生, 等. 胶州湾及邻近水域曼氏无针乌贼的生长和季节分布[J]. *海洋科学*, 1997, 38(5): 61-64.
- Zhang B L, Sun D W, Bi H S, *et al.* Growth and seasonal distribution of *Sepiella maindroni* in the Jiaozhou Bay and adjacent waters[J]. *Marine Science*, 1997, 38(5): 61-64 (in Chinese).
- [24] Yin F, Sun P, Peng S M, *et al.* The respiration, excretion and biochemical response of the juvenile common Chinese cuttlefish, *Sepiella maindroni* at different temperatures[J]. *Aquaculture*, 2013, 402-403: 127-132.
- [25] 吴耀泉, 唐质灿. 黄河口及莱州湾海域曼氏无针乌贼的群体组成和洄游分布[J]. *水产学报*, 1990, 14(2): 149-152.
- Wu Y Q, Tang Z C. Population composition and migratory distribution of cuttlefish (*Sepiella maindroni* de Rochebrune) in the Huanghe estuary and the Laizhou

- Gulf[J]. *Journal of Fisheries of China*, 1990, 14(2): 149-152 (in Chinese).
- [26] 靳立兵. 曼氏无针乌贼 Peroxiredoxin 1 和 Peroxiredoxin 4 的克隆及表达 [D]. 宁波: 宁波大学, 2013.
- Jin L B. Molecular cloning and recombinant expression of Peroxiredoxin 1 and Peroxiredoxin 4 from *Sepiella maindroni*[D]. Ningbo: Ningbo University, 2013 (in Chinese).
- [27] 许著廷. 曼氏无针乌贼血蓝蛋白基因的克隆与表达分析 [D]. 宁波: 宁波大学, 2012.
- Xu Z T. Molecular cloning and expression nanlysis of hemocyanin gene from *Sepiella maindroni*[D]. Ningbo: Ningbo University, 2012 (in Chinese).
- [28] Caldwell R L. An observation of inking behavior protecting adult *Octopus bocki* from predation by green turtle (*Chelonia mydas*) hatchlings[J]. *Pacific Science*, 2005, 59(1): 69-72.
- [29] 赵晨曦, 韩庆喜, 韩子儒, 等. 虎斑乌贼喷墨对其生长及存活的影响[J]. 宁波大学学报(理工版), 2020, 33(4): 6-11.
- Zhao C X, Han Q X, Han Z R, *et al.* Effects of *Sepia pharaonis* ink release on its growth and survival[J]. *Journal of Ningbo University (NSEE)*, 2020, 33(4): 6-11 (in Chinese).
- [30] Wen J, Zhong H, Xiao J, *et al.* A transcriptome resource for pharaoh cuttlefish (*Sepia pharaonis*) after ink ejection by brief pressing[J]. *Marine Genomics*, 2016, 28: 53-56.
- [31] 姜胜超. 波浪作用下船舶运动与液舱内流体晃荡的耦合数值分析 [D]. 大连: 大连理工大学, 2013.
- Jiang S C. Numerical simulation on coupled effect between ship motion and liquid sloshing under wave action[D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2013 (in Chinese).
- [32] 张伟, 王有基, 李伟明, 等. 运输密度和盐度对大黄鱼幼鱼皮质醇、糖元及乳酸含量的影响[J]. 水产学报, 2014, 38(7): 973-980.
- Zhang W, Wang Y J, Li W M, *et al.* Effects of transportation density and salinity on cortisol, glycogen and lactate of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) juveniles[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(7): 973-980 (in Chinese).
- [33] 黄春红. 草鱼肝胰脏脂肪蓄积评价及变化机制初探 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2014.
- Huang C H. Evaluation and mechanism of lipid accumulation in the hepatopancreas of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2014 (in Chinese).
- [34] 樊甄姣, 刘志鸿, 杨爱国. 氨氮对栉孔扇贝血淋巴活性氧含量和抗氧化酶活性的影响[J]. 海洋水产研究, 2005, 26(1): 23-27.
- Fan Z J, Liu Z H, Yang A G. Effect of ammonia-N on the content of ROIs and the activities of antioxidant enzyme in the haemolymph of *Chlamys farreri*[J]. *Marine Fisheries Research*, 2005, 26(1): 23-27 (in Chinese).
- [35] 刘红艳, 宋丰举, 雷蕾, 等. 1267例乳腺癌临床与免疫组化指标的相关性分析[J]. *中国肿瘤临床*, 2011, 38(11): 656-659.
- Liu Y H, Song F J, Lei L, *et al.* Correlation of clinical features with immunohistochemical indices of 1267 cases of breast cancer[J]. *Chinese Journal of Clinical Oncology*, 2011, 38(11): 656-659 (in Chinese).
- [36] 曹桂花, 许荣, 薛明涛, 等. 中性粒细胞百分比与高龄感染患者死亡率相关性分析[J]. *中华老年多器官疾病杂志*, 2018, 17(1): 39-42.
- Cao G H, Xu R, Xue M T, *et al.* Correlation between neutrophil percentage and mortality of very old infected patients[J]. *Chinese Journal of Multiple Organ Diseases in the Elderly*, 2018, 17(1): 39-42 (in Chinese).
- [37] Speed T. A correlation for the 21st century[J]. *Science*, 2011, 334(6062): 1502-1503.
- [38] Reshef D N, Reshef Y A, Finucane H K, *et al.* Detecting novel associations in large data sets[J]. *Science*, 2011, 334(6062): 1518-1524.
- [39] Genitsaris S, Stefanidou N, Sommer U, *et al.* Phytoplankton blooms, red tides and mucilaginous aggregates in the urban Thessaloniki Bay, Eastern Mediterranean[J]. *Diversity*, 2019, 11(8): 136.
- [40] Gu Y B, You Y X, Thrush S, *et al.* Responses of the macrobenthic community to the Dalian Bay oil spill based on co-occurrence patterns and interaction networks[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2021, 171: 112662.

Oscillator frequency effects on death rate and physiological status of *Sepiella japonica*

ZHOU Shanshan^{1,2}, ZHOU Yongdong^{1,2}, LI Zhe^{1,2}, OUYANG Hong¹, ZHEN Xiaoman¹,
LIANG Jun^{1,2}, CHEN Junlin³, CHEN Jiayi¹, XU Kaida^{1,2*}

(1. Zhejiang Marine Fisheries Research Institute, Zhoushan 316000, China;

2. Key Laboratory of Sustainable Utilization of Technology Research for Fishery Resources of
Zhejiang Province, Zhoushan 316000, China;

3. Zhejiang Province Puto Ocean and Fishery Bureau, Zhoushan 316100, China)

Abstract: Enhancement and releasing are significant for the restoration of *Sepiella japonica*. To increase the survival rate of *S. japonica* during transportation of proliferation and releasing, the effects of different oscillation frequencies (0, 60, 100, 120, 140 and 160 r/min) on death rate, the contents of lactate and glycogen, as well as enzyme activity of adult *S. japonica* were studied. The results showed that the death rate increased with the frequency increases in other groups, except for a slight decrease at the frequency of 160 r/min. The highest death rate was 97.1% at the frequencies of 120 and 160 r/min, and it was obviously higher than that at the frequencies of 0, 60 and 100 r/min ($P < 0.05$). The death time mainly range from 4-8 h after oscillation and the lower the frequency, the later death time appeared. Except for some statistics fluctuations in a few groups, it basically followed the trend that glycogen content in the two tissues decreased with the increase of frequency, while the lactate content increased. Compared to the treatment group, the experimental group at the frequency of 140 r/min had a significant difference in lactate and glycogen contents ($P < 0.05$). Except for the experimental group at the frequency of 60 r/min, the activity of alanine transaminase (ALT) and glutamic-oxalacetic transaminase (GOT) in pancreas tissues decreased, and the activity of superoxide dismutase (SOD) increased with the increase of frequency. Compared to other experimental groups, these three enzymes at the groups of 120, 140 and 160 r/min respectively, had a significant difference ($P < 0.05$). The activity of alkaline phosphatase (ALP) increased with the increase of frequency, the groups of 140 r/min and 160 r/min had a significant difference compared with other groups ($P < 0.05$). The death rate of squid was positively correlated with SOD, lactate content and ALP, and negatively correlated with muscle glycogen content, GOT, ALT and digestive gland glycogen content ($P < 0.01$). In conclusion, during the transport of *S. japonica*, energy exhaustion and hepatopancreas damage could be the major reasons of high death rate. In order to solve this problem, the oscillation frequency during transportation should be below 100 r/min and the transportation time under 3 hours and should avoid strong waggle.

Key words: *Sepiella japonica*; oscillation frequency; ink-jet; death rate; glycogen; lactate

Corresponding author: XU Kaida. E-mail: xkd1981@163.com

Funding projects: National Key Research and Development Program of China (2019YFD0901204, 2019YFD0901205, 2020YFD0900804); Key Research and Development Program of Zhejiang Province (2019C02056)