

DOI: 10.20103/j.stxb.202207282167

朱岚倩, 张秀梅, 张宗航, 史会来, 郭浩宇. 盐度胁迫下曼氏无针乌贼的行为和生理响应. 生态学报, 2023, 43(19): 8087-8098.

Zhu L Q, Zhang X M, Zhang Z H, Shi H L, Guo H Y. Behavioral and physiological responses of *Sepiella japonica* exposed to salinity changes. Acta Ecologica Sinica, 2023, 43(19): 8087-8098.

## 盐度胁迫下曼氏无针乌贼的行为和生理响应

朱岚倩<sup>1</sup>, 张秀梅<sup>1</sup>, 张宗航<sup>2</sup>, 史会来<sup>3</sup>, 郭浩宇<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> 浙江海洋大学水产学院, 舟山 316022

<sup>2</sup> 汕头大学理学院广东省海洋生物技术重点实验室, 汕头 515063

<sup>3</sup> 浙江省海洋水产研究所, 舟山 316021

**摘要:** 盐度变化会引起头足类动物渗透调节、免疫能力和激素分泌异常等一系列生理应激反应, 同时还会引发应激诱导的喷墨行为等异常行为变化, 最终可能导致头足类因渗透失衡出现大量死亡。结合头足类苗种繁育过程中因海水盐度波动出现的摄食及行为异常等问题, 探究了盐度胁迫对曼氏无针乌贼 (*Sepiella japonica*) 行为活性、组织结构、渗透调节以及免疫相关酶活性的影响, 明确了其对盐度变化的应激反应及适应能力。结果显示: 在高盐胁迫下曼氏无针乌贼的行为活性显著增加 ( $P < 0.05$ ), 且倾向于绕水槽壁游动; 与 21‰ 组相比, 27‰ 组和 33‰ 组肌肉、鳃和肝脏组织结构呈现较严重的损伤, 15‰ 组的各组织结构无明显变化; 随着盐度的升高, 鳃中  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP 酶活性呈现先降低后升高趋势 ( $P < 0.05$ ); 33‰ 组脑中皮质醇含量显著高于其他处理组 ( $P < 0.05$ ); 盐度升高或降低均会导致鳃和肝脏中超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (Catalase, CAT) 活性显著升高 ( $P < 0.05$ ), 丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) 含量显著增加 ( $P < 0.05$ ), 溶菌酶 (Lysozyme, LZM) 活性显著降低 ( $P < 0.05$ )。综合分析认为, 曼氏无针乌贼具有较好的耐低盐能力, 高盐胁迫会引发其类焦虑行为。此外, 在研究设定的 15‰—33‰ 盐度范围内, 盐度变化还会引起其渗透调节以及免疫相关酶活性的改变。研究结果为阐释头足类适应盐度波动的调节机理, 控制适宜的养殖环境提供了参考依据。

**关键词:** 曼氏无针乌贼; 盐度胁迫; 行为反应; 组织结构; 渗透调节; 免疫

## Behavioral and physiological responses of *Sepiella japonica* exposed to salinity changes

ZHU Lanqian<sup>1</sup>, ZHANG Xiumei<sup>1</sup>, ZHANG Zonghang<sup>2</sup>, SHI Huilai<sup>3</sup>, GUO Haoyu<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> School of Fishery, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China

<sup>2</sup> Guangdong Provincial Key Laboratory of Marine Biology, University College of Science, Shantou 515063, China

<sup>3</sup> Marine Fishery Research Institute of Zhejiang Province, Zhoushan 316021, China

**Abstract:** *Sepiella japonica* is an important commercial marine cuttlefish that is widely distributed around the coastal waters of the North-West Pacific and Northern Indian Ocean. The survival rate of the cuttlefish living in aquaculture farms may be subject to salinity fluctuations due to typhoons, rainstorms and tidal water flows. Changes in salinity may cause a series of physiological and behavioral stress responses in cephalopods, e.g. osmoregulation, immune capacity, hormone secretion and stress-induced inking behavior, and can even lead to mass deaths due to osmotic stress. Thus, during the process of seedling production of cephalopods, it is important to maintain the water salinity at the proper levels. To better understand the stress responses and the adaptability of cephalopods to cope with salinity stress, the changes in the behavioral activity, histopathology, osmoregulation and immune related enzymes of *Sepiella japonica* at different salinities of 15, 21, 27 and

基金项目: 浙江省重点研发计划项目 (2021C02047); 国家自然科学基金项目 (41676153)

收稿日期: 2022-07-28; 网络出版日期: 2023-05-16

\* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: haoyuguo@163.com

33‰ exposed to 48 h were investigated in this study. The results showed that the distance moved, average velocity, the frequency of accelerations, active time and manic time of *Sepiella japonica* increased significantly under high salinity stress (27‰) ( $P < 0.05$ ). The cuttlefish tended to swimming around the tank wall when they were exposed to high salinity (27‰). Compared to the control groups (21‰), cuttlefish from the 27‰ and 33‰ groups showed more serious disorder in the tissue structures of muscle, gill and liver, while no changes was found in the 15‰ groups. With the increase in salinity, the activity of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in the gill decreased firstly and then increased ( $P < 0.05$ ). The cortisol content in brain tissue in the 33‰ groups was significantly higher than that from the other treatment groups ( $P < 0.05$ ). The fluctuation of salinity could lead to the significant increase of activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) ( $P < 0.05$ ), the content of malondialdehyde (MDA) ( $P < 0.05$ ), and a significant decrease of activity of lysozyme (LZM) ( $P < 0.05$ ) in gills and liver. Based on these results, it can be concluded that the *Sepiella japonica* has good tolerance to low-salt conditions, but high-salt stress could cause serious inking behavior and anxiety-like behavior. In addition, the range of salinities used in this study (15‰—33‰) could cause adverse effects on osmoregulation and immune related enzymes for *Sepiella japonica*. The results of the study would provide a reference for elucidating the regulatory mechanisms used by cephalopods to cope with salinity stress, and also offer valuable information to hatchery managers to help keep appropriate culture environment for *Sepiella japonica*.

**Key Words:** *Sepiella japonica*; salinity stress; behavioral response; histopathology; osmoregulation; immune

盐度是海洋生态系统中一个重要的生态因子,其波动会影响海洋生物的行为、免疫及其他生理反应<sup>[1-3]</sup>。研究表明,盐度对海洋生物的影响主要是通过影响其体液渗透压来实现的,据此可将海洋生物渗透调节类型分为渗透压调节型(Osmoregulatory)和渗透压随变型(Osmoconformer)<sup>[4]</sup>。头足类属于渗透压随变型,自身缺乏主动调节渗透压的能力,必须通过离子转运调控和神经内分泌调控等多种调节机制来维持渗透压平衡<sup>[5]</sup>,其中  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP 酶在维持机体的渗透调节和离子调节过程中发挥着重要的作用<sup>[6]</sup>。除了环境盐度,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP 酶活性还受渗透压调节激素的调控。研究发现,皮质醇能够通过促使大西洋鲑(*Salmo salar*)鳃泌氯细胞增生、分化以及  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP 酶活性的增加来促进  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  和  $\text{Cl}^-$  等无机离子的转运,进而影响机体的离子渗透及新陈代谢以适应周围的环境<sup>[7]</sup>。此外,生物处于应激状态时,体内大量活性氧(ROS)增生,进而可能引起氧化应激反应,破坏蛋白质、脂质以及 DNA 的结构和功能,导致细胞内稳态的丧失<sup>[8]</sup>。非特异性免疫酶能够清除机体内大量自由基,在应对由代谢和环境变化引起的氧化应激中发挥着重要作用<sup>[9]</sup>。另一方面,外界环境的变化,如温度、盐度和光照周期,均会影响水生生物的行为<sup>[10-11]</sup>。当遭遇环境突变时,鱼类通常会表现得异常活跃,产生各种类焦虑行为,包括移动距离增加和趋触性行为频发<sup>[12-13]</sup>。为了量化由环境胁迫引起的行为变化,通常采用运动跟踪分析软件来测试水生生物的个性行为,如好斗性<sup>[14]</sup>、勇敢性<sup>[15]</sup>和活跃性<sup>[16]</sup>。目前,此类行为观察实验的测试对象主要是啮齿类动物和斑马鱼(*Danio rerio*)等模式生物<sup>[17]</sup>,尚未见有关头足类的类焦虑行为测试。

曼氏无针乌贼(*Sepiella japonica*)是一种重要的海洋经济头足类,广泛分布于西北太平洋和北印度洋沿岸海域,曾是东海四大海产之一<sup>[18]</sup>。自 20 世纪 70 年代末以来,受高强度的渔业捕捞活动、环境污染、生境退化等因素的影响,曼氏无针乌贼资源量明显衰退,部分海区已出现了性早熟和个体小型化的趋势<sup>[19]</sup>。为了恢复这一重要的渔业资源,科研人员针对其渔业生物学、繁殖生物学、增殖放流等开展了一系列研究工作<sup>[20-22]</sup>,目前已初步具备了规模化人工繁育技术。然而,在人工繁育过程中,由于曼氏无针乌贼独特的外套腔结构(包裹内脏的外套腔内有海水交换),使得该物种对水环境变化具有强烈的应激反应,导致人工繁育亲体的保育存在较多困难。以往研究表明,温度、水体酸碱度等环境因子的突变均会引发其严重的应激反应,造成亲体的大规模死亡<sup>[23-25]</sup>。在人工苗种繁育实践过程中,常出现因海水盐度波动引发的曼氏无针乌贼摄食及行为异常。为了提高育苗过程中曼氏无针乌贼繁殖亲体的存活率,研究其对水环境盐度波动的响应及调节机制具有

十分重要的意义。

为此,本研究对比分析了不同盐度环境中曼氏无针乌贼的行为活跃性以及肌肉、肝脏和鳃组织结构变化,分析了盐度胁迫对其渗透调节以及免疫相关酶活性的影响,为深入了解曼氏无针乌贼盐度变化适应能力和调节机制提供基础数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验对象和饲养条件

实验对象为曼氏无针乌贼,于 2021 年 10 月取自浙江省海洋水产研究所西轩岛养殖基地。挑选同一批孵化出膜、体色鲜艳、活力良好的乌贼成体[平均体重为(20.35±3.84) g;平均胴长为(5.39±0.41) cm;平均胴宽为(3.51±0.43) cm]共 240 尾用于实验。实验前将曼氏无针乌贼置于 500 L 的圆形 PP 实验桶中适应一周,无异常行为反应后,开始正式的养殖实验。暂养期间所有水体环境因子与养殖条件均保持一致,实验用水为砂滤海水,池内温度(22±1)℃,盐度(21±0.5)‰,水位控制在 80 cm 左右。每个圆桶配有一个气石,24 h 持续充氧,以确保水体溶解氧保持在 8—9 mg/L。每天按 50% 比例换水 1 次并定时饱食投喂海捕冰鲜虾两次,投喂 1 h 后用虹吸管除去残饵。

### 1.2 实验设计

在实际养殖生产过程中曼氏无针乌贼的养殖水体盐度基本处于 20‰—21.5‰ 之间,因此,参照此盐度范围,预实验共设置 5 个盐度组(15‰、20‰、25‰、30‰、35‰)。每个盐度组投放 20 尾乌贼,观察各盐度组乌贼 24 h 内的活力状态、摄食状况等。预实验结果显示,暴露于 35‰ 条件下,乌贼喷墨现象严重,部分个体出现死亡;暴露于 15‰ 条件下,乌贼的死亡率为 0%,仅摄食率有所下降。因此,结合预实验结果,本实验共设置 4 个盐度梯度,分别为 15‰、21‰(对照)、27‰和 33‰,每个梯度设 2 个平行。将 240 尾曼氏无针乌贼随机放入 8 个(4 个盐度梯度×2 个平行)500 L 圆形 PP 实验桶中,每桶放入 30 尾乌贼,各桶内海水初始盐度均为 21‰。放入乌贼后,通过添加淡水以 2—3‰/d 的速度使海水盐度逐渐降低到 15‰;通过添加海盐以 2—3‰/d 的速度使海水盐度逐渐增加到 27‰和 33‰;对照组(21‰组)通过添加砂滤海水维持盐度稳定。待桶内海水盐度达到预设值后维持 48 h,随后结束实验后取样。实验期间使用 LAQUAtwin-Salt-22 盐度计(Miyanonishi-cho, Kisshoin Minami-ku, 日本)监测海水盐度,如发现盐度波动,及时调节至预设值水平。实验期间的日常管理与暂养期间一致,换水时更换等温等盐海水。

### 1.3 取样与分析

实验结束后,每桶随机取样 10 尾曼氏无针乌贼,使用过量 MS-222(tricaine methanesulfonate, 200 mg/L)将乌贼麻醉致死,测量其体重(精确至 0.01 g)、胴长和胴宽(精确至 0.01 cm),随后在冰盒上快速解剖乌贼,取鳃、肌肉、肝脏和脑组织,用预冷的 NaCl 溶液(0.86%)清洗后,将部分组织样本固定于 Bouin 氏液中,用于组织学分析;另一部分经液氮冷冻后置于-80℃ 保存,用于生理分析。取样后每桶剩余 10 尾乌贼用于行为观察。

将组织置于 Bouin 氏液中固定后,用 70% 酒精冲洗,经酒精梯度脱水、二甲苯透明、石蜡包埋处理<sup>[26]</sup>。将获得的蜡块用显微切片机(HistoCore BIOCUT, 德国徕卡公司)进行横向、纵向连续切片,切片厚度 5 μm。经苏木精—伊红(H.E.)染色,中性树胶封藏<sup>[27]</sup>。使用光学显微镜(奥林巴斯, CX43, 日本)拍照并观察。

因乌贼的血液较难采集,故本实验使用了乌贼的脑组织测定皮质醇含量。使用肝脏和鳃组织测定渗透调节和免疫相关酶活性。将所取肝脏、鳃和脑组织按重量(g):体积(mL)=1:9 的比例加入预冷的磷酸盐缓冲溶液(PBS, pH 7.4),冰浴条件下制成匀浆,取上清液用于后续分析。测定超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)、溶菌酶(Lysozyme, LZM)、Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP 酶活性以及丙二醛(Malondialdehyde, MDA)、皮质醇(Cortisol)所用试剂盒购自南京建成生物工程研究所(南京,江苏),总蛋白测定采用考马斯亮蓝法<sup>[28]</sup>,实验后续所有操作均严格按照试剂盒操作说明执行。

## 1.4 行为观察

行为观察在一个 100 cm × 50 cm × 50 cm 的玻璃水槽中进行,水位控制在 10 cm,水槽上方装有 GoPro 相机(30 帧/s)。实验前所有乌贼禁食 24 h。实验开始后,随机选取 1 尾乌贼转移至行为观察装置中适应 30 min。随后开始录像(持续 10 min),每个盐度处理组共拍摄 20 尾乌贼。行为观察水槽内海水的盐度与各盐度处理组一致。使用 Noldus 动物运动轨迹跟踪软件(EthoVision XT 15, Noldus, 荷兰)解析每尾乌贼的游泳轨迹,计算不同盐度处理组乌贼的平均游泳速度、加速频率、移动距离、静止时间、活跃时间以及狂躁时间等<sup>[29-30]</sup>,其中将乌贼活跃度低于 20%时定义为静止状态,活跃度在 20%—60%之间时定义为活跃状态,活跃度高于 60%时定义为狂躁状态。

## 1.5 数据处理

所有数据均采用 SPSS 19.0 统计分析软件进行统计分析,且所得数据均用平均值±标准差(mean±S.D.)表示。各处理组之间行为活跃性和生理分析采用单因素方差分析(one-way ANOVA),对符合正态分布和方差齐性检验的数据进行 LSD 检验。在所有比较中,以 21‰作为对照组,取  $P < 0.05$  作为差异显著标准。

## 2 结果

### 2.1 盐度胁迫后曼氏无针乌贼的行为活跃性

随着盐度升高,曼氏无针乌贼喷墨次数显著增加。33‰组因喷墨现象严重,无法开展行为观测,故无行为观测数据。行为视频分析结果发现,盐度胁迫对曼氏无针乌贼的行为活跃性有显著影响(图 1)。27‰组乌贼的移动距离、平均游泳速度、加速频率、活跃时间和狂躁时间均显著高于其他处理组( $P < 0.05$ ),但是各处理组之间乌贼的静止时间无显著差异( $P > 0.05$ )。此外,27‰组乌贼的运动轨迹发生明显变化,表现得异常活跃,且倾向于绕水槽壁游动。

### 2.2 盐度胁迫后曼氏无针乌贼肌肉、肝脏和鳃的组织结构变化

图 2 显示了不同盐度胁迫下曼氏无针乌贼的肌肉组织结构变化。21‰组的肌纤维排列整齐且紧密,肌肉束间隙较小;与 21‰组相比,15‰组肌纤维发生了吸水膨胀,肌肉组织结构模糊;27‰组肌纤维排列整齐,略呈波浪状;33‰组肌纤维间隙较 21‰组显著增加,肌纤维断裂且弯曲呈波浪状。

图 3 显示了不同盐度胁迫下曼氏无针乌贼的肝脏组织结构变化。21‰组的肝脏组织结构完整,由许多不规则的、边缘清晰的肝小叶组成;15‰组的肝脏组织由于在低渗透压作用下吸水膨胀,肝细胞体积增大;随着盐度增加,曼氏无针乌贼肝小叶轮廓模糊,甚至破裂。与 21‰组相比,盐度升高或降低均会导致肝细胞数量显著增加。

图 4 显示了不同盐度胁迫下曼氏无针乌贼的鳃组织结构变化。21‰组的鳃组织结构完整清晰,线粒体丰富细胞和扁平上皮细胞排列致密有序,鳃丝中间分布着丰富的微血管;15‰组的鳃组织中线粒体丰富细胞的数量显著多于 21‰组,扁平上皮细胞排列紊乱,鳃片的片层表面积明显增加;随着盐度的增加,线粒体丰富细胞和扁平上皮细胞核溶解,扁平上皮细胞数量减少,鳃丝轮廓模糊不完整,出现坏死脱落和缺损。此外,在 33‰的高盐胁迫下,鳃丝肿胀淤血,鳃片的片层表面积显著减小。

### 2.3 盐度胁迫后曼氏无针乌贼的渗透调节变化

通过对比分析发现,盐度对曼氏无针乌贼鳃组织的  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP 酶活性影响显著。与 21‰组相比,15‰组和 33‰组鳃组织的  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP 酶活性显著升高( $P < 0.05$ ),27‰组鳃组织的  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP 酶活性也呈现升高的趋势(图 5)。

盐度对曼氏无针乌贼脑组织中皮质醇的含量影响显著。33‰组乌贼脑组织中的皮质醇含量显著高于其他处理组( $P < 0.05$ ),而其他三个处理组的皮质醇含量无显著差异( $P > 0.05$ ) (图 6)。

### 2.4 盐度胁迫后曼氏无针乌贼免疫相关酶活性变化

图 7 分析了在不同盐度胁迫下曼氏无针乌贼鳃和肝脏中 SOD、CAT、LZM 活性及 MDA 含量的变化。与

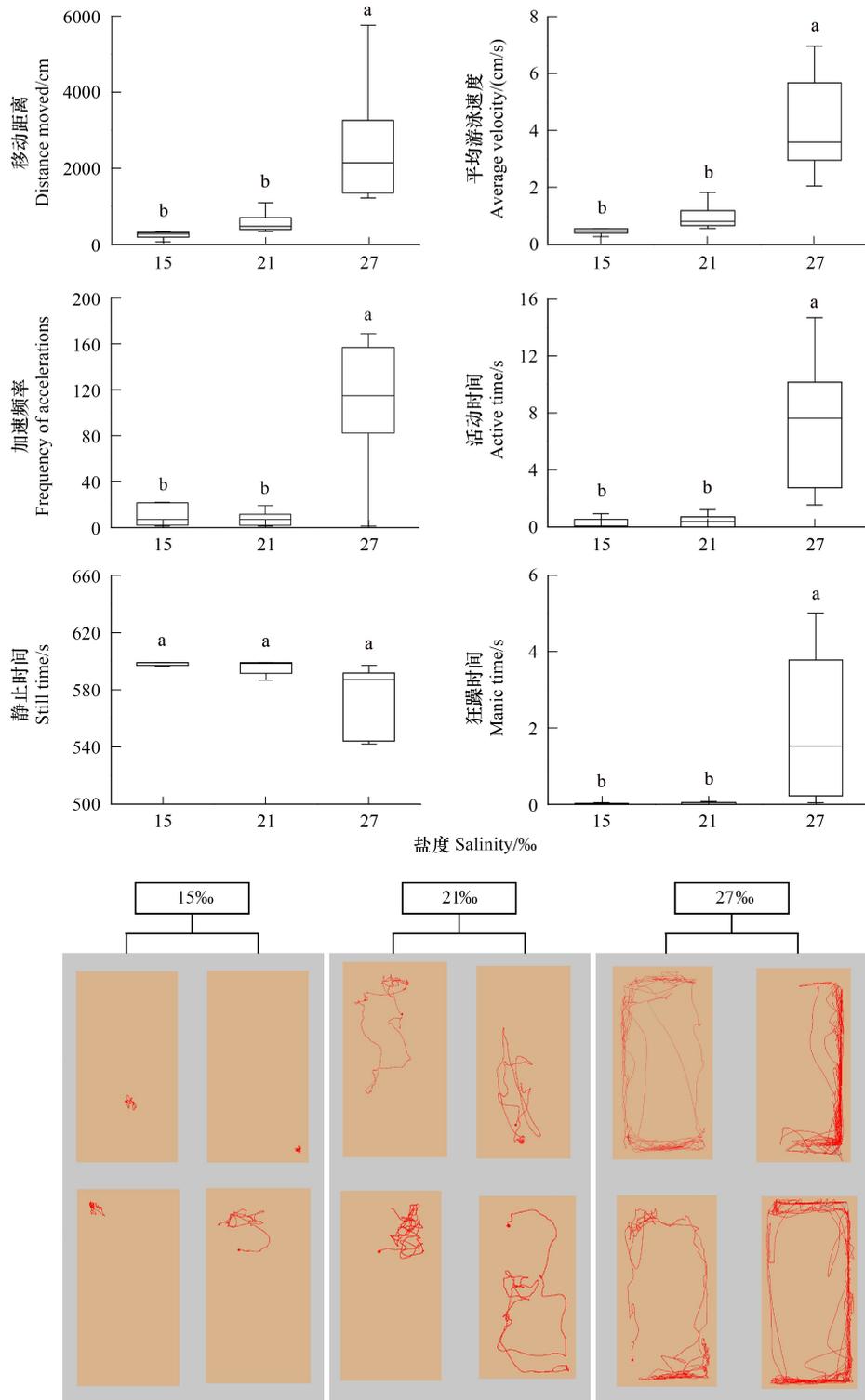


图 1 盐度胁迫对曼氏无针乌贼行为反应的影响

Fig.1 The behavioral response of *S. japonica* after exposure to salinities of 15‰, 21‰ and 27‰  
不同字母表示不同处理组之间差异显著 ( $P < 0.05$ ) (ANOVA,  $N = 20$ )

21‰组相比,高盐和低盐胁迫下鳃组织 MDA 含量均显著升高 ( $P < 0.05$ ), 33‰组鳃组织的 SOD 活性显著升高 ( $P < 0.05$ ), 27‰组和 33‰组鳃组织的 CAT 活性显著升高 ( $P < 0.05$ ), 27‰组和 33‰组鳃组织的 LZM 活性显著

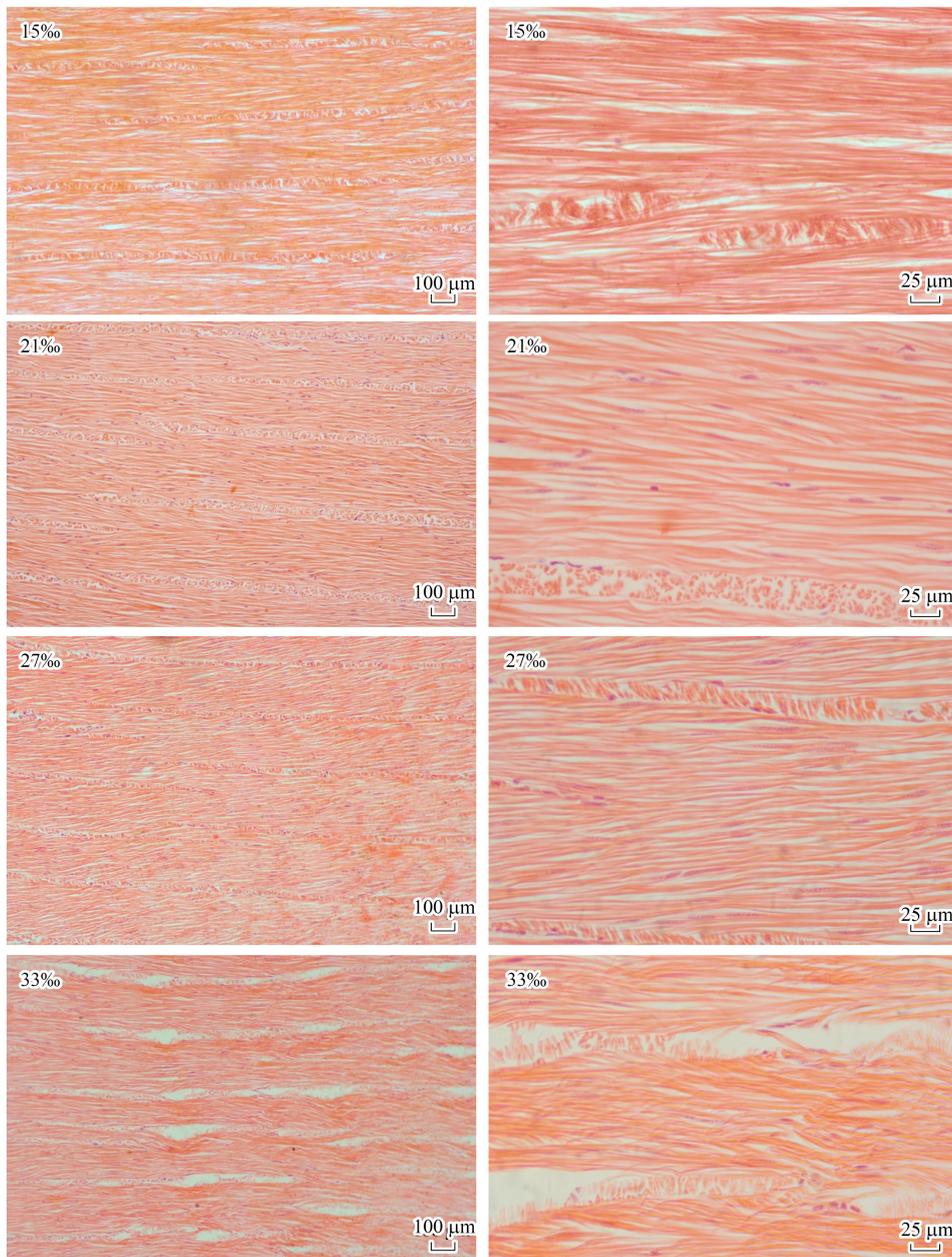


图2 盐度胁迫对曼氏无针乌贼肌肉组织结构的影响

Fig.2 Histological changes of the muscle tissue in *S. japonica* exposed to different salinity levels

降低 ( $P < 0.05$ )。此外,与 21‰组相比,高盐和低盐胁迫下肝脏组织的 MDA 含量显著升高 ( $P < 0.05$ ), 15‰组和 33‰组肝脏组织的 SOD 活性显著升高 ( $P < 0.05$ ), 33‰组肝脏组织的 CAT 活性显著升高 ( $P < 0.05$ ), 各处理组之间肝脏组织中 LZM 活性无显著差异 ( $P > 0.05$ )。

### 3 讨论

#### 3.1 盐度胁迫对曼氏无针乌贼行为活跃性的影响

行为是生物个体对外界刺激的可视化反应,是生物内在因素和外在非生物因素共同作用的结果<sup>[17]</sup>。暴露于环境胁迫下,生物会产生各种异常行为,如正常光照强度下虎斑乌贼 (*Sepia pharaonis*) 背部体色较浅,通常静卧水底;强光条件下虎斑乌贼逐渐离底出现于水体中上层,还伴随着喷墨现象<sup>[31]</sup>。本研究中,暴露于高

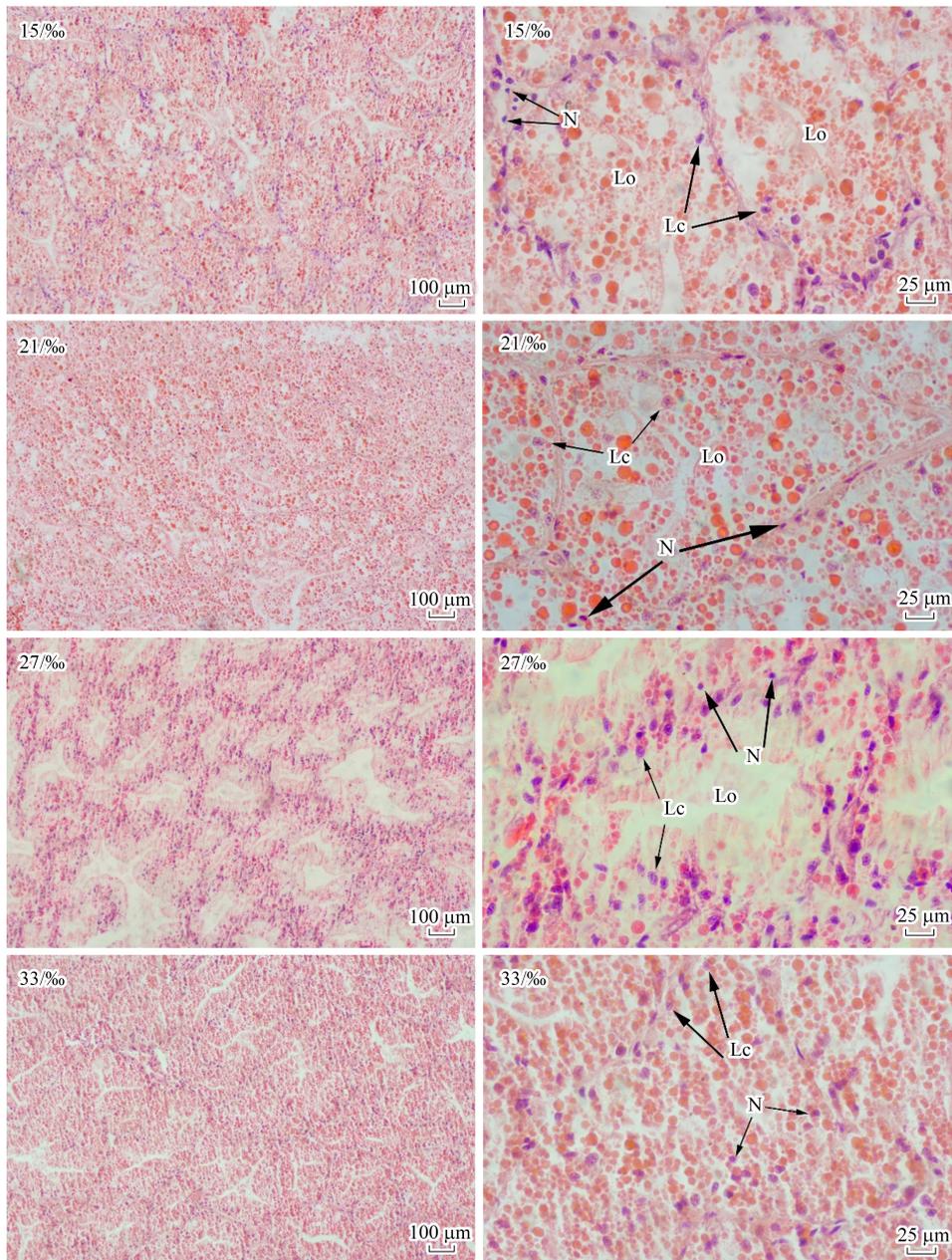


图3 盐度胁迫对曼氏无针乌贼肝脏组织结构的影响

Fig.3 Histological changes of the liver tissue in *S. japonica* exposed to different salinity levels

Lo: 肝小叶, Hepatic lobule; N: 细胞核, Nuclear; Lc: 肝细胞, Liver cell

盐胁迫下的曼氏无针乌贼具有较明显的喷墨行为。与 21‰组和 15‰组相比, 27‰组曼氏无针乌贼运动活跃性明显增加, 同时倾向于绕水槽壁游动和撞击水槽壁。这些结果表明, 高盐胁迫可能导致曼氏无针乌贼产生类焦虑行为, 反映了乌贼为适应盐度波动而采取的行为适应性策略, 即面对环境异常变化, 首先在行为层面作出反应, 即逃离胁迫区域, 在实验水槽的有限空间内, 则表现为异常活跃的绕水槽壁游动行为。

### 3.2 盐度胁迫对曼氏无针乌贼组织结构的影响

由于渗透调节作用, 水生动物的肌肉、肝脏和鳃等组织结构均会对环境盐度波动产生适应性变化<sup>[24,32]</sup>, 从而保持较好的摄食、免疫和渗透调节等重要功能。对于曼氏无针乌贼等一年生的头足类来说, 肌肉组织是其生长性状的核心, 占体重的 75%—90%<sup>[33]</sup>。已有研究表明, 肌肉组织结构受到盐度的影响, 最终通过

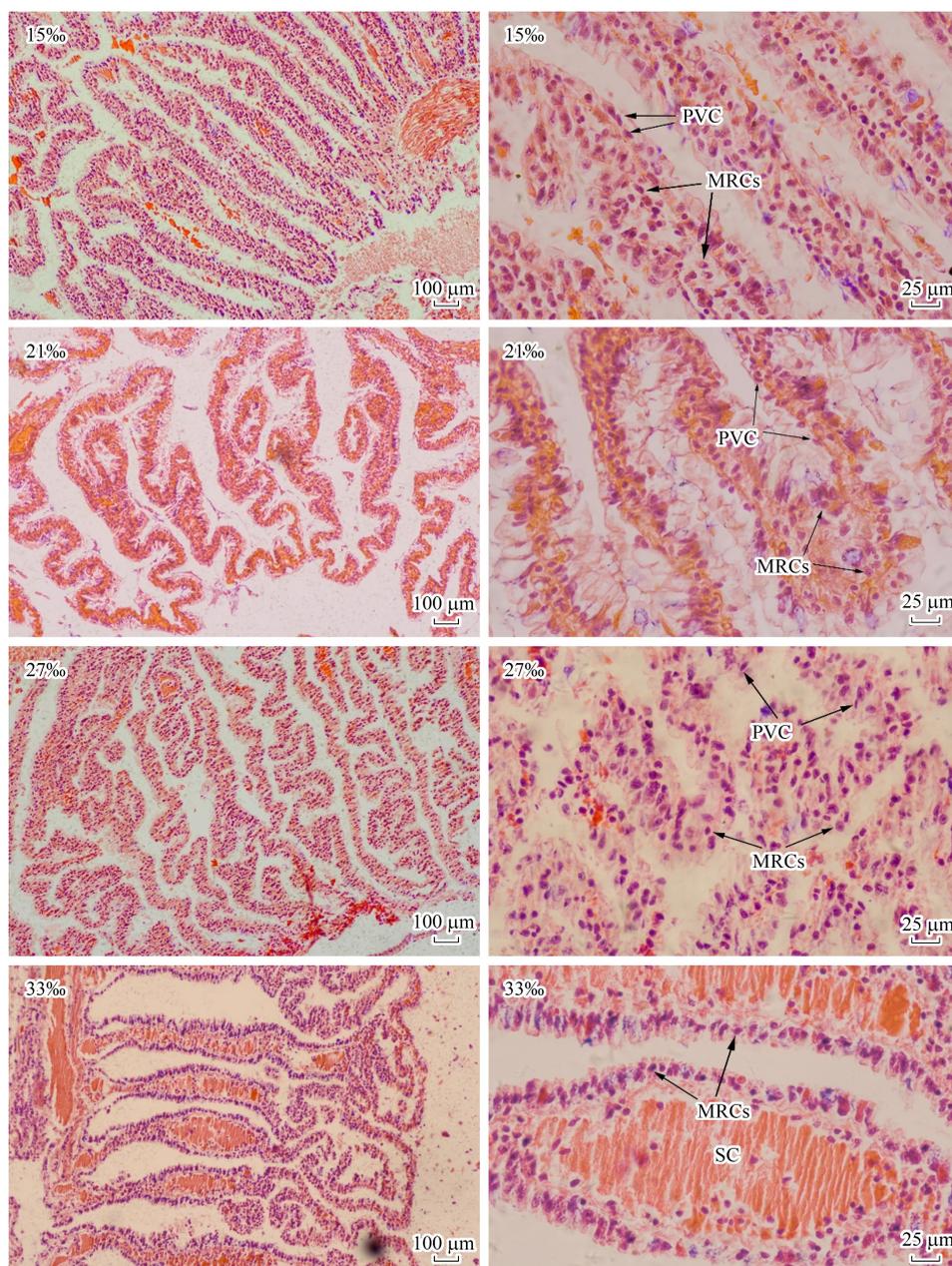


图4 盐度胁迫对曼氏无针乌贼鳃组织结构的影响

Fig.4 Histological changes of the gill tissue in *S. japonica* exposed to different salinity levels

PVC: 扁平上皮细胞, Pavement cells; MRCs: 线粒体丰富细胞, Mitochondrion-rich cells; SC: 鳃丝肿胀淤血, Swelling and congestion of gill filament

肌肉细胞和肌纤维的变化来调控肌肉的生长速率<sup>[34-35]</sup>。本研究结果显示,不同盐度胁迫对曼氏无针乌贼的肌肉组织结构产生了显著影响。随着盐度的增加,肌肉细胞间隙增加,肌纤维断裂,肌理变得不规则,相似的变化规律在虎斑乌贼中被证实<sup>[24]</sup>。由此推测,若长期生活在高盐环境中,会造成曼氏无针乌贼肌肉细胞和肌纤维的损伤,影响肌肉的生长速率,进而对其生长发育产生不利影响。

肝脏对生物体新陈代谢和免疫防御起着重要的作用<sup>[36]</sup>。尽管肝脏不是主要的渗透调节器官,但其对环境胁迫较敏感,能够反映生物的整体健康状况<sup>[37-39]</sup>。Yin 等(2018)观察了暴露于盐度胁迫的虎斑乌贼幼体肝脏组织切片,结果发现高盐组肝细胞出现了坏死和严重退化<sup>[24]</sup>。本研究中,与 21‰组相比,15‰组肝细胞

的体积和数量显著增加,无明显的组织损伤,而 27‰组和 33‰组肝细胞发生了坏死和降解,肝小叶轮廓模糊不清,甚至出现破损和不完整的现象。这可能与曼氏无针乌贼主要栖息于近岸水域有关,受长江冲淡水的影响,东海水域盐度波动幅度较大,曼氏无针乌贼更适应在较低盐度中生活,33‰高盐环境已超出了其能承受的生理调节范围,导致肝脏组织在结构功能方面发生一定程度的病理性改变。

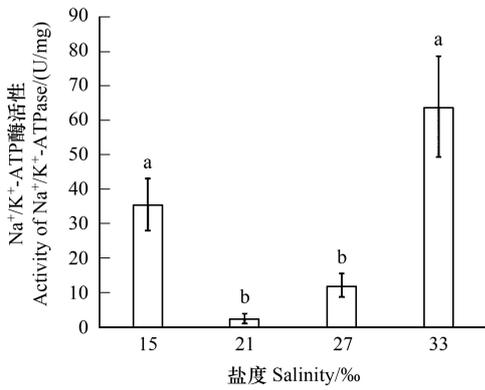


图5 盐度胁迫对曼氏无针乌贼鳃组织中 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP 酶活性的影响

Fig.5 Variation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity in gill tissues of *S. japonica* exposed to different salinity levels  
不同字母表示不同处理组之间差异显著 ( $P < 0.05$ ) (ANOVA,  $N = 5$ )

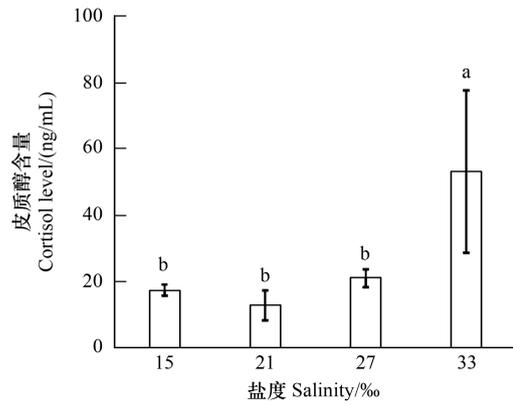


图6 盐度胁迫对曼氏无针乌贼脑组织中皮质醇含量的影响

Fig.6 Variation of cortisol levels in brain tissues of *S. japonica* exposed to different salinity levels

不同字母表示不同处理组之间差异显著 ( $P < 0.05$ ) (ANOVA,  $N = 5$ )

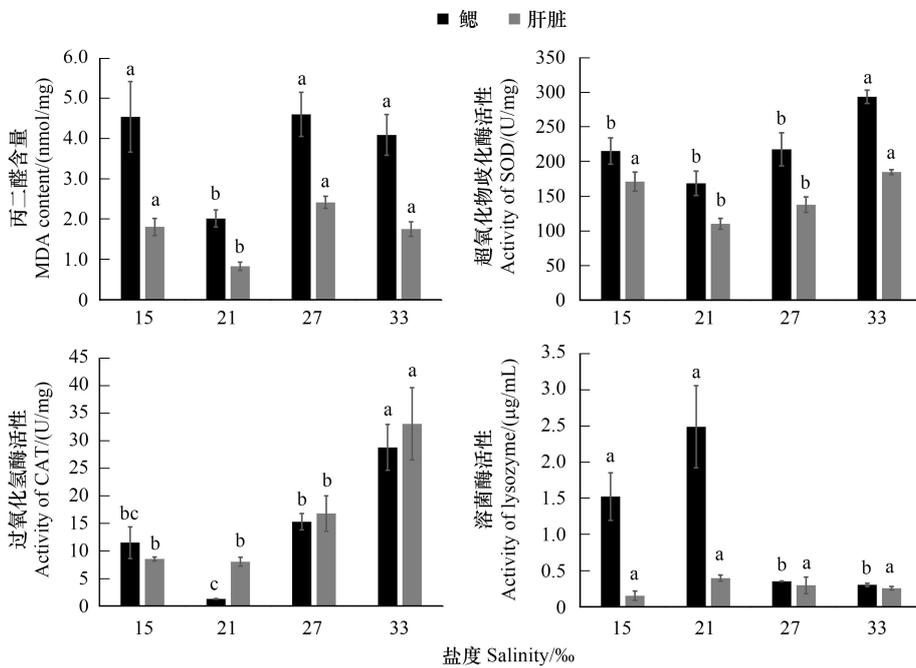


图7 盐度胁迫对曼氏无针乌贼免疫相关酶活性的影响

Fig.7 Variation of immune related enzymes activity in gill and liver tissues of *S. japonica* exposed to different salinity levels

不同字母表示不同处理组之间差异显著 ( $P < 0.05$ ) (ANOVA,  $N = 5$ ); SOD: Superoxide dismutase; CAT: Catalase; MDA: Malondialdehyde

对大多数水生动物来说,鳃在维持机体内外渗透压平衡中起着重要的作用<sup>[40]</sup>。当环境盐度波动时,鳃组织结构往往最先受到影响,如细胞大小、数量和位置以及鳃片表面积,这些变化都会直接影响机体的生理过

程<sup>[41-42]</sup>。Wu 等(2021)在光学和电子显微镜下观察鳃组织结构变化,发现低盐胁迫会导致虎斑乌贼幼体鳃上皮组织边缘不完整,细胞脱落,扁平上皮细胞表面微嵴受损<sup>[43]</sup>。Zhou 等(2020)研究发现,低盐胁迫下大泷六线鱼(*Hexagrammos otakii*)鳃组织结构中线粒体丰富细胞数量减少、体积变小,扁平上皮细胞和粘液细胞数量明显增加<sup>[44]</sup>。本研究发现,随着盐度的增加,曼氏无针乌贼鳃的线粒体丰富细胞和扁平上皮细胞核溶解,扁平上皮细胞数量减少,鳃丝出现肿胀淤血和轮廓模糊不完整,鳃片表面积显著减小。高盐胁迫会导致鳃组织结构发生病理性变化,而其损伤会影响渗透调节,损害鳃的离子交换和含氮废物的排泄等正常的生理活动,可能是导致乌贼在高盐环境下死亡的主要原因之一。

总体来说,曼氏无针乌贼在 15‰—27‰盐度环境中各器官组织结构正常,表明其具有较好的低盐适应能力。

### 3.3 盐度胁迫对曼氏无针乌贼渗透调节的影响

在不同盐度环境下,鳃丝的线粒体丰富细胞主要发挥离子吸收和离子分泌的作用,其表面分布着丰富的  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP 酶<sup>[45]</sup>。研究发现,水体环境盐度对水生生物鳃中  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP 酶活性的影响具有种间特异性,如高盐环境下,俄罗斯鲟(*Acipenser gueldenstaedtii*)幼鱼  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP 酶活性显著降低<sup>[46]</sup>;随盐度的升高,黑壳色合浦珠母贝(*Pinctada fucata*)  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP 酶活性先升高后降低<sup>[47]</sup>。本研究中,高盐和低盐胁迫均导致曼氏无针乌贼鳃中  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP 酶活性显著升高( $P < 0.05$ ),表明曼氏无针乌贼的耐盐范围较广,这可能与其栖息于近海水域有关。在军曹鱼(*Rachycentron canadum*)<sup>[48]</sup>和暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*)<sup>[49]</sup>等广盐性鱼类的研究中也存在类似的现象。

水生生物面对外在压力源时可以通过下丘脑-垂体-肾间组织(HPI)轴调控体内皮质醇的分泌,随后引起免疫功能、渗透调节等一系列生化反应,最终导致个体水平发生相应的变化,如抗病力、生长等<sup>[50-51]</sup>。以往的研究显示,适当的皮质醇浓度可以提高鳃中  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP 酶活性,增加鳃对离子的转运作用,从而提高对环境的适应能力<sup>[52]</sup>。然而,过高的皮质醇浓度亦会导致较低的摄食量和饲料转换效率,较高的能量消耗,较慢的生长速度<sup>[53]</sup>。本研究发现,仅 33‰组曼氏无针乌贼的脑皮质醇含量显著升高,其余各处理组无显著差异,表明在 15—27‰盐度条件下曼氏无针乌贼受到的应激压力较小,适量的皮质醇浓度有助于增强鳃中  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP 酶活性,提供盐度波动过程所需的能量,从而提高对水体盐度的适应性;然而,高盐胁迫下乌贼的渗透应激反应较强,更多能量用于应对环境应激造成的渗透压调节,不利于其生长发育。

### 3.4 盐度胁迫对曼氏无针乌贼免疫相关酶活性的影响

与其他软体动物一样,头足类仅具有非特异性免疫系统,没有免疫球蛋白来抵御外来病原体的入侵<sup>[54]</sup>。众所周知,环境胁迫会损害细胞功能,产生大量的 ROS,最终引发脂质过氧化<sup>[8]</sup>。为维持氧化还原过程处于平衡状态,生物能够通过特定的抗氧化酶清除 ROS,因此抗氧化酶活性通常被作为氧化应激的生物标志<sup>[55]</sup>。本研究结果表明,高盐胁迫 48 h 后,曼氏无针乌贼鳃和肝脏组织中的 SOD 和 CAT 活性以及 MDA 含量均显著升高,表明暴露于短期高盐胁迫下,曼氏无针乌贼的渗透调节和解毒能力受损,这可能与鳃和肝脏组织结构损伤有关。此外,软体动物的非特异性免疫不仅受非特异性酶的调控,免疫因子也在防御和灭菌中发挥着重要作用<sup>[56]</sup>。LZM 作为一种非特异性免疫因子,可参与机体的免疫防御<sup>[57]</sup>。本研究发现,高盐胁迫会导致鳃中 LZM 含量显著降低,这可能是由于在高盐胁迫下乌贼的非特异性免疫系统受到抑制,免疫功能受损,大量免疫因子被消耗,从而导致 LZM 含量的减少。

## 4 结论

综上所述,曼氏无针乌贼具有较好的耐低盐能力,高盐胁迫对其行为和生理具有显著影响。当水体盐度过高时,曼氏无针乌贼会出现严重的喷墨现象,组织器官结构亦出现严重损伤,渗透调节能力和免疫功能下降,表明该物种对高盐环境耐受能力较弱。因此,在曼氏无针乌贼增殖苗种繁育过程中,应注意控制养殖水体盐度( $< 27‰$ ),以实现苗种的高效健康生产。

## 参考文献(References):

- [ 1 ] 李娜, 赵玉超, 王仁杰, 沈敏, 李玉全. 高盐胁迫对凡纳滨对虾消化及免疫相关酶活力的影响. 生态学报, 2018, 38(4): 1411-1417.
- [ 2 ] Luz R K, Martínez-Álvarez R M, De Pedro N, Delgado M J. Growth, food intake regulation and metabolic adaptations in goldfish (*Carassius auratus*) exposed to different salinities. *Aquaculture*, 2008, 276(1/2/3/4): 171-178.
- [ 3 ] 徐大风. 真蛸幼体生长发育及环境胁迫对幼体的影响[D]. 上海: 上海海洋大学, 2019.
- [ 4 ] 龙晓文. 盐度对中华绒螯蟹性腺发育、渗透压调节和生理代谢的影响及其调控机制研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2019.
- [ 5 ] Castellano G C, da Veiga M P T, Mazzini F S, Vidal E A G, Freire C A. Paralarvae of *Octopus vulgaris* Type II are stenohaline conformers: relationship to field distribution and dispersal. *Hydrobiologia*, 2018, 808(1): 71-82.
- [ 6 ] Yi H D, Chen X L, Liu S, Han L Q, Liang J H, Su Y Q, Lai H, Bi S, Liu X G, Zhang Y, Zhao X P, Li G F. Growth, osmoregulatory and hypothalamic-pituitary-somatotropic (HPS) axis response of the juvenile largemouth bass (*Micropterus salmoides*), reared under different salinities. *Aquaculture Reports*, 2021, 20: 100727.
- [ 7 ] Pelis R M, McCormick S D. Effects of growth hormone and cortisol on  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$  cotransporter localization and abundance in the gills of Atlantic salmon. *General and Comparative Endocrinology*, 2001, 124(2): 134-143.
- [ 8 ] Lushchak V I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, 2011, 101(1): 13-30.
- [ 9 ] Liu Z F, Gao X Q, Yu J X, Qian X M, Xue G P, Zhang Q Y, Liu B L, Hong L. Effects of different salinities on growth performance, survival, digestive enzyme activity, immune response, and muscle fatty acid composition in juvenile American shad (*Alosa sapidissima*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 2017, 43(3): 761-773.
- [ 10 ] Pang X, Fu S J, Zhang Y G. Acclimation temperature alters the relationship between growth and swimming performance among juvenile common carp (*Cyprinus carpio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2016, 199: 111-119.
- [ 11 ] Hamilton T J, Szaszkievicz J, Krook J, Richards J G, Stiller K, Brauner C J. Continuous light (relative to a 12: 12 photoperiod) has no effect on anxiety-like behaviour, boldness, and locomotion in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) post-smolts in recirculating aquaculture systems at a salinity of either 2.5 or 10 ppt. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2022, 263: 111070.
- [ 12 ] Collier A D, Kalueff A V, Echevarria D J. The rights and wrongs of zebrafish: behavioral phenotyping of zebrafish. Switzerland: Springer International Publishing Switzerland, 2017: 45-72.
- [ 13 ] Schnörr S J, Steenbergen P J, Richardson M K, Champagne D L. Measuring thigmotaxis in larval zebrafish. *Behavioural Brain Research*, 2012, 228(2): 367-374.
- [ 14 ] Hamilton T J, Kwan G T, Gallup J, Tresguerres M. Acute fluoxetine exposure alters crab anxiety-like behaviour, but not aggressiveness. *Scientific Reports*, 2016, 6: 19850.
- [ 15 ] Johnson A, Hamilton T J. Modafinil decreases anxiety-like behaviour in zebrafish. *Peer J*, 2017, 5: e2994.
- [ 16 ] Stewart A, Cachat J, Wong K, Gaikwad S, Gilder T, DiLeo J, Chang K, Utterback E, Kalueff A V. Homebase behavior of zebrafish in novelty-based paradigms. *Behavioural Processes*, 2010, 85(2): 198-203.
- [ 17 ] Tierney K B. Behavioural assessments of neurotoxic effects and neurodegeneration in zebrafish. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 2011, 1812(3): 381-389.
- [ 18 ] 董正之. 世界大洋经济头足类生物学. 济南: 山东科学技术出版社, 1991: 197-207.
- [ 19 ] 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. *浙江水产学院学报*, 1986(2): 99-104.
- [ 20 ] 吴常文, 董智勇, 迟长风, 丁峰. 曼氏无针乌贼(*Sepiella maindroni*)繁殖习性及其产卵场修复的研究. *海洋与湖沼*, 2010, 41(1): 39-46.
- [ 21 ] 宋微微, 王春琳. 养殖对曼氏无针乌贼(*Sepiella maindroni*)群体遗传多样性的影响. *海洋与湖沼*, 2009, 40(5): 590-595.
- [ 22 ] 朱岚倩, 郭浩宇, 张宗航, 秦依琳, 史会来, 张秀梅. 野生和养殖曼氏无针乌贼亲体形态、生化组分及其胚胎发育的比较. *水产学报*, 2022, 46(8): 1403-1413.
- [ 23 ] Neumeister H, Ripley B, Preuss T, Gilly W F. Effects of temperature on escape jetting in the squid *Loligo opalescens*. *The Journal of Experimental Biology*, 2000, 203(Pt 3): 547-557.
- [ 24 ] Yin S J, Zhang L M, Zhang L L, Wan J X, Song W, Jiang X M, Park Y D, Si Y X. Metabolic responses and arginine kinase expression of juvenile cuttlefish (*Sepia pharaonis*) under salinity stress. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 113: 881-888.
- [ 25 ] Moura É, Pimentel M, Santos C P, Sampaio E, Pegado M R, Lopes V M, Rosa R. Cuttlefish early development and behavior under future high  $\text{CO}_2$  conditions. *Frontiers in Physiology*, 2019, 10: 975.
- [ 26 ] Wijayanti G, Setyawan P, Kurniawati I D. A simple paraffin embedded protocol for fish egg, embryo, and larvae. *Scripta Biologica*, 2017, 4(2): 85.
- [ 27 ] Gamble M. The hematoxylin and eosin. *Theory and Practice of Histological Techniques*. Amsterdam: Elsevier, 2008: 121-134.
- [ 28 ] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1/2): 248-254.
- [ 29 ] 王蕾, 唐金玉, 覃英莲, 曾令清, 彭姜岚, 付世建. 饥饿对中华倒刺鲃幼鱼代谢、个性和集群的影响. *生态学报*, 2019, 39(3): 1095-1104.
- [ 30 ] Qian L, Qi S Z, Wang Z, Magnuson J T, Volz D C, Schlenk D, Jiang J Z, Wang C J. Environmentally relevant concentrations of boscalid exposure affects the neurobehavioral response of zebrafish by disrupting visual and nervous systems. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 404: 124083.

- [31] 周爽男, 陈奇成, 江茂旺, 蒋霞敏, 彭瑞冰, 韩庆喜, 黄晨, 赵晨曦, 李建平. 光照强度对虎斑乌贼生长、存活、代谢及相关酶活性的影响. 应用生态学报, 2019, 30(6): 2072-2078.
- [32] Gibbons T C, McBryan T L, Schulte P M. Interactive effects of salinity and temperature acclimation on gill morphology and gene expression in threespine stickleback. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2018, 221: 55-62.
- [33] Semmens J M, Pecl G T, Villanueva R, Jouffre D, Sobrino I, Wood J B, Rigby P R. Understanding octopus growth: patterns, variability and physiology. *Marine and Freshwater Research*, 2004, 55(4): 367.
- [34] 李小勤, 李星星, 冷向军, 刘贤敏, 王锡昌, 李家乐. 盐度对草鱼生长和肌肉品质的影响. 水产学报, 2007, 31(3): 343-348.
- [35] Rowlerson A M, Veggetti A. Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture species. *Fish Physiology*, 2001, 18: 103-140.
- [36] Liang Y S, Wu Y, Li J P, Peng R B, Jiang M W, Jiang X M, Chen S Q, Lin J Y. Effects of ammonia toxicity on the histopathology, detoxification, oxidative stress, and immune response of the cuttlefish *Sepia pharaonis* and the mitigation of  $\gamma$ -aminobutyric acid. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2022, 232: 113256.
- [37] Ruiz-Picos R A, Eltas Sedeño-Díaz J, López-López E. Histopathological indicators in fish for assessing environmental stress. *Environmental Indicators*, 2014: 663-675.
- [38] Fernandes C, Fontainhas-Fernandes A, Ferreira M, Salgado M A. Oxidative stress response in gill and liver of *Liza saliens*, from the esmoriz-paramos coastal lagoon, Portugal. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2008, 55(2): 262-269.
- [39] Cleetus R I, Rebello V T. Biochemical and histological studies on juvenile tilapia, *Oreochromis mossambicus* exposed to salinity stress. *International Journal of Applied Research*, 2017, 3: 40-43.
- [40] Bi B L, Gao Y, Jia D, Kong L F, Su Y H, Rong H, Wu X W, Wang X W, Hu Z Y, Hu Q. Growth influence of juvenile golden trout (*Oncorhynchus mykiss*) in different osmotic conditions: implications for tissue histology, biochemical indicators, and genes transcription involved in GH/IGF system. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2021, 47(2): 583-597.
- [41] Masroor W, Farcy E, Gros R, Lorin-Nebel C. Effect of combined stress (salinity and temperature) in European sea bass *Dicentrarchus labrax* osmoregulatory processes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2018, 215: 45-54.
- [42] Nilsson G E, Dymowska A, Stecyk J A W. New insights into the plasticity of gill structure. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, 2012, 184(3): 214-222.
- [43] Wu K L, Xin H W, Yuan Y M, Zhao Y, Song W W, Wang C L, Mu C K, Li R H. Physiological, biochemical and molecular responses of *Sepia pharaonis* juveniles to low salinity. *Aquaculture Research*, 2021, 52(9): 4317-4324.
- [44] Zhou Z, Hu F W, Li W J, Yang X H, Hallerman E, Huang Z T. Effects of salinity on growth, hematological parameters, gill microstructure and transcriptome of fat greenling *Hexagrammos otakii*. *Aquaculture*, 2021, 531: 735945.
- [45] 王梦洁, 储天琪, 刘峰, 詹炜, 楼宝, 徐万土. 盐度胁迫对小黄鱼(*Larimichthys polyactis*)抗氧化酶、非特异性免疫酶和  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP 酶活力的影响. 海洋学报, 2021, 43(2): 59-66.
- [46] 屈亮, 庄平, 章龙珍, 赵峰, 刘鉴毅, 王好. 盐度对俄罗斯鲟幼鱼血清渗透压、离子含量及鳃丝  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP 酶活力的影响. 中国水产科学, 2010, 17(2): 243-251.
- [47] Sun J, Chen M Q, Fu Z Y, Yang J R, Zhou S J, Yu G, Zhou W L, Ma Z H. A comparative study on low and high salinity tolerance of two strains of *Pinctada fucata*. *Frontiers in Marine Science*, 2021, 8: 704907.
- [48] 曹丹煜. 军曹鱼幼鱼盐度适应特性及渗透压调节分子机制的初步分析[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2020.
- [49] Li J J, Wang J, Yang L J, Chen Y F, Yang Z. Changes in plasma osmolality and  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase activity of juvenile obscure puffer *Takifugu obscurus* following salinity challenge. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2014, 56: 111-117.
- [50] Wendelaar Bonga S E. The stress response in fish. *Physiological Reviews*, 1997, 77(3): 591-625.
- [51] Mommsen T P, Vijayan M M, Moon T W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 1999, 9(3): 211-268.
- [52] McCormick S D. Endocrine control of osmoregulation in teleost fish. *American Zoologist*, 2001, 41(4): 781-794.
- [53] Zhang Z H, Bai Q Q, Xu X W, Guo H Y, Zhang X M. Effects of environmental enrichment on the welfare of juvenile black rockfish *Sebastes schlegelii*: growth, behavior and physiology. *Aquaculture*, 2020, 518: 734782.
- [54] Castellanos-Martínez S, Gestal C. Pathogens and immune response of cephalopods. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2013, 447: 14-22.
- [55] Ghanavatinasab Y, Salati A P, Movahedinia A, Shahriari A. Changes in gill antioxidant status in *Acanthopagrus sheim* exposed to different environmental salinities. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*, 2019, 43(4): 1479-1483.
- [56] 刘志鸿, 牟海津, 王清印. 软体动物免疫相关酶研究进展. 海洋水产研究, 2003, 24(3): 86-90.
- [57] Dominguez M, Takemura A, Tsuchiya M. Effects of changes in environmental factors on the non-specific immune response of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture Research*, 2005, 36(4): 391-397.