



## 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

朱岚倩<sup>1</sup>, 郭浩宇<sup>1,2</sup>, 张宗航<sup>3</sup>, 秦依琳<sup>1</sup>, 史会来<sup>4</sup>, 张秀梅<sup>1,2\*</sup>

(1. 浙江海洋大学水产学院, 浙江 舟山 316022;

2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266235;

3. 中国海洋大学, 海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266100;

4. 浙江省海洋水产研究所, 浙江 舟山 316021)

**摘要:** 为优化曼氏无针乌贼人工繁育技术, 提高人工增殖苗种的产量与质量, 实验采用生态学方法, 对比分析了野生和养殖曼氏无针乌贼的表观形态、生化组分及其受精卵的形态差异, 探究了光照周期与受精卵胶质外膜对曼氏无针乌贼胚胎发育的影响。结果显示, 野生和养殖曼氏无针乌贼的表观形态、生化组分均存在显著差异, 野生群体性成熟规格远大于养殖群体, 肌肉和肝脏组织中的粗脂肪含量显著低于养殖群体, 卵巢中的粗蛋白含量则显著高于养殖群体。养殖亲体所产黑卵在 12D12L 光照周期条件下孵化率最高, 所产白卵在 24D 和 24L 条件下孵化率最高, 野生亲体所产卵在 24D 和 12D12L 条件下孵化率最高。随光照时间的延长, 受精卵的平均孵化时间具有先增加后降低的趋势, 表明光照周期是影响曼氏无针乌贼胚胎发育的重要因素。实验发现, 将受精卵胶质外膜剥离处理后, 养殖亲体所产黑、白卵的平均孵化时间具有减少的趋势, 但孵化率显著下降。建议在曼氏无针乌贼人工苗种生产过程中, 尽量选用大规模野生乌贼作为繁育亲体。此外, 在受精卵孵化期间, 应对孵化池进行适当遮光处理, 避免受精卵长时间暴露于强光照环境中, 以提高孵化率和仔乌成活率。研究结果可为曼氏无针乌贼人工苗种繁育技术优化提供参考。

**关键词:** 曼氏无针乌贼; 表观形态; 生化组分; 胶质外膜; 光照周期; 胚胎发育

**中图分类号:** S 917.4

**文献标志码:** A

曼氏无针乌贼 (*Sepiella japonica*) 隶属于软体动物门 (Mollusca) 头足纲 (Cephalopoda) 乌贼目 (Sepioidea) 乌贼科 (Sepiidae) 乌贼属 (*Sepia*), 俗称墨鱼、日本无针乌贼, 为 1 年生的中型乌贼<sup>[1]</sup>。广泛分布于西北太平洋和北印度洋沿岸海域, 在我国主要分布在浙江和福建沿海, 与大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)、小黄鱼 (*L. polyactis*) 和带鱼 (*Trichiurus lepturus*) 并称为东海四大海产, 曾是浙江省主要渔获种类, 历史渔业捕捞量最高年产量

超 6 万 t<sup>[2]</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、产卵场破坏等原因的影响, 野生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, 严重影响了曼氏无针乌贼的资源结构及种群数量<sup>[3]</sup>。为了恢复这一重要渔业资源, 自 21 世纪初, 我国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>[2]</sup>, 并突破了人工育苗的关键技术。目前, 已在浙江沿海开展了大

收稿日期: 2021-11-23 修回日期: 2022-05-10

资助项目: 国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”重点专项 (2019YFD0901303); 浙江省重点研发计划项目 (2021C02047); 舟山市科学技术局项目 (2020C43255)

第一作者: 朱岚倩 (照片), 从事渔业资源增殖学研究, E-mail: zhulanqian0911@163.com

通信作者: 张秀梅, 从事渔业资源增殖学研究, E-mail: xiumei1227@163.com



规模的增殖放流实践<sup>[4]</sup>,在一定程度上恢复了曼氏无针乌贼的自然资源<sup>[5]</sup>。然而近年来,随着人工繁育世代的增加,个体小型化等现象开始在曼氏无针乌贼人工养殖群体中出现,严重影响了其人工育苗生产。已有研究发现,在自然海域中,曼氏无针乌贼至少需要6~8个月,体质量达到300~400 g后才能达到性成熟,但是在养殖环境中仅需3~4个月,体质量约100 g时便可以达到性成熟<sup>[6]</sup>,甚至部分人工养殖群体还会出现一年2次繁殖的现象<sup>[7]</sup>。同时伴随着受精卵白化率上升,孵化率下降,卵色泽黯淡,颜色和规格差异增大等现象<sup>[8]</sup>,对曼氏无针乌贼增殖苗种的产量与质量造成诸多不利影响。

在人工育苗过程中,光照是影响水生生物胚胎发育的重要因素之一<sup>[9-10]</sup>。适宜的光照周期能够改善其胚胎的发育状况,提高胚胎的孵化率。研究发现,光照周期对水生生物胚胎发育的影响具有种间特异性,如随着光照时间的增加,斑马鱼(*Danio rerio*)胚胎孵化率呈现先增加后减小的趋势<sup>[11]</sup>。光照周期对半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)胚胎的孵化率影响不大<sup>[12]</sup>。此外,对于头足类动物来说,其受精卵通常包裹于独特的黏附性胶质外膜之中。在胚胎发育过程中,胶质外膜具有保护胚体、参与物质和气体交换等功能,对胚胎发育内环境的稳定起着重要作用<sup>[13]</sup>。但胶质外膜在保护受精卵免受外界环境干扰的同时,可能会阻碍胚胎与外界环境之间的物质交换,进而对其胚胎发育及受精卵孵化产生影响。目前,尚未见针对光照周期和胶质外膜对曼氏无针乌贼胚胎发育影响的相关研究报道。本研究在室内控制条件下,以野生和养殖曼氏无针乌贼为实验对象,比较了野生和养殖亲体及其受精卵之间的生物学特征差异,并研究了光照周期与手工剥离受精卵胶质外膜对胚胎发育的影响,旨在为曼氏无针乌贼人工繁育技术优化提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

本实验所用曼氏无针乌贼养殖亲体于2021年4月取自浙江省海洋水产研究所,是在人工繁育条件下由F<sub>1</sub>受精卵培育成熟的个体;野生亲体于2021年5月捕自浙江省舟山海域。选取已达到性成熟的曼氏无针乌贼(野生与养殖各30尾),用吸水纸吸干体表的水分,测量体质量、胴长、胴

宽等形态学指标后,在冰盒上进行解剖,取肌肉、肝脏以及性腺组织,储存于-80 °C超低温冰箱中,用于生化组分的测定。另选取野生和养殖曼氏无针乌贼健康亲体各100尾(50♀、50♂)暂养于2个圆形水槽内(8 000 L),并放置附卵绳收集受精卵。产卵期间池内水温控制在21~23 °C,盐度25~26,24 h连续充氧,溶解氧含量保持在8~9 mg/L。每天早、中、晚投喂海捕冰鲜虾。乌贼亲体自然交配产卵后,收集受精卵,置于40 cm × 30 cm × 30 cm直列式循环水槽中孵化。随机选取发育状态良好的受精卵共1 440枚(野生黑卵480枚、养殖黑卵480枚、养殖白卵480枚),其中3种类型的受精卵各选取100枚,使用分析天平(BSA224S,赛多利斯,德国)称量受精卵质量(精确至0.01 g),使用游标卡尺测量卵的长径与短径(精确至0.01 mm)。然后将受精卵放入水槽中进行孵化,统计分析不同处理方式下受精卵的孵化状况。

### 1.2 实验方法

野生和养殖曼氏无针乌贼生化组分比较实验 野生和养殖曼氏无针乌贼常规生化组分分析采用AOAC(1995)的标准方法<sup>[14]</sup>。将样品置于105 °C烘箱中烘至恒重测量水分含量。利用凯氏定氮仪(KjelFlexK-360, BUCHI, 瑞士)测量粗蛋白含量。利用索氏抽提仪(FOSS Soxtec-2055, FOSS, 瑞典)测量粗脂肪含量。利用550 °C马弗炉(LY-HJ-GWL30, 东莞立一试验设备有限公司)测量灰分含量。

光照周期和胶质外膜对野生和养殖曼氏无针乌贼胚胎发育的影响 以受精卵类型、是否存在胶质外膜、光照周期3个因素设计交互实验。各实验组设置如表1所示,每个处理组设置4个平行,每个平行放置20枚受精卵。参照雷舒涵<sup>[15]</sup>的方法将曼氏无针乌贼受精卵的胶质外膜手工去除,仅保留卵膜和胚胎,剥离后可以根据卵的弹性和饱满程度来判断卵膜是否已破裂或损伤。光照由水槽上方11 W的LED灯提供,水体光照强度约为2 000 lx,为避免环境光源的干扰,所有水槽面均采用不透光的黑色塑料膜包裹。仔乌孵化出膜后统计孵化率、平均孵化时间、初孵仔乌体质量与胴长等指标。

### 1.3 数据分析

测定指标主要包括受精卵的表观形态、孵化率、平均孵化时间、初孵仔乌体质量与胴长。

表 1 实验设计

**Tab. 1 Design of experiments**

组别 groups	光照周期 light cycle	胶质外膜 capsule layer	卵类型 egg type
1	无光照组 24D	去膜组 DG	野生黑卵 WB
2	无光照组 24D	对照组 CG	野生黑卵 WB
3	无光照组 24D	去膜组 DG	养殖黑卵 CB
4	无光照组 24D	对照组 CG	养殖黑卵 CB
5	无光照组 24D	去膜组 DG	养殖白卵 CW
6	无光照组 24D	对照组 CG	养殖白卵 CW
7	中光照组 12D12L	去膜组 DG	野生黑卵 WB
8	中光照组 12D12L	对照组 CG	野生黑卵 WB
9	中光照组 12D12L	去膜组 DG	养殖黑卵 CB
10	中光照组 12D12L	对照组 CG	养殖黑卵 CB
11	中光照组 12D12L	去膜组 DG	养殖白卵 CW
12	中光照组 12D12L	对照组 CG	养殖白卵 CW
13	全光照组 24L	去膜组 DG	野生黑卵 WB
14	全光照组 24L	对照组 CG	野生黑卵 WB
15	全光照组 24L	去膜组 DG	养殖黑卵 CB
16	全光照组 24L	对照组 CG	养殖黑卵 CB
17	全光照组 24L	去膜组 DG	养殖白卵 CW
18	全光照组 24L	对照组 CG	养殖白卵 CW

Notes: DG. capsule layers depletion group, CG. control group, WB. wild black eggs, CB. hatchery-reared black eggs, CW. hatchery-reared white eggs, the same below

$$\text{孵化率 (\%)}: F = \frac{A_2}{A_1} \times 100\%$$

$$\text{平均孵化时间 (d)}: D = \frac{\sum(b \times T)}{A_2}$$

式中,  $A_1$  为乌贼卵数 (枚),  $A_2$  为孵化出膜的仔乌个数 (只),  $b$  为每天孵化出膜的仔乌个数 (只),  $T$  为孵化时间 (d)。

使用 SPSS Statistics 19.0 软件对实验数据进行统计分析, 所得数据均采用平均值±标准差 (mean±SD) 表示, 使用 RStudio 4.0 软件进行绘图。野生和养殖曼氏无针乌贼亲体之间的表观形态及生化组分的差异采用独立样本  $t$  检验进行分析。光照周期和胶质外膜对野生和养殖曼氏无针乌贼胚胎发育的影响采用方差分析, 分析不同处理对受精卵孵化率、平均孵化时间、初孵仔乌体质量与胴长的影响。  $P < 0.05$  为差异显著,  $P < 0.01$  为差异极显著。

## 2 结果

### 2.1 野生和养殖曼氏无针乌贼亲体表观形态对比分析

野生亲体的体质量、胴长和胴宽均显著大于

养殖亲体 ( $P < 0.05$ ) (表 2), 其体质量约为养殖亲体的 8 倍。此外, 通过胴长-体质量的置信椭圆图可以看出, 野生和养殖亲体在表观形态上存在显著差异, 且养殖亲体的体质量和胴长相关性较大, 野生亲体则表现出更高的离散性 (图 1)。

表 2 野生和养殖曼氏无针乌贼亲体的形态学指标

**Tab. 2 Morphological characteristics of wild and hatchery-reared *S. japonica***

群体 groups	体质量/g body weight	胴长/mm mantle length	胴宽/mm mantle width
野生群体 wild group	199.85±35.72 <sup>a</sup>	113.86±8.87 <sup>a</sup>	63.78±6.33 <sup>a</sup>
养殖群体 hatchery-reared group	24.95±7.26 <sup>b</sup>	58.11±6.78 <sup>b</sup>	37.21±4.95 <sup>b</sup>

注: 同列数据上标不同字母表示 2 组间存在显著差异 ( $P < 0.05$ ), 表 4 同

Notes: different superscript letters within vertical rows represent significant differences between the two groups ( $P < 0.05$ ), the same in Tab. 4

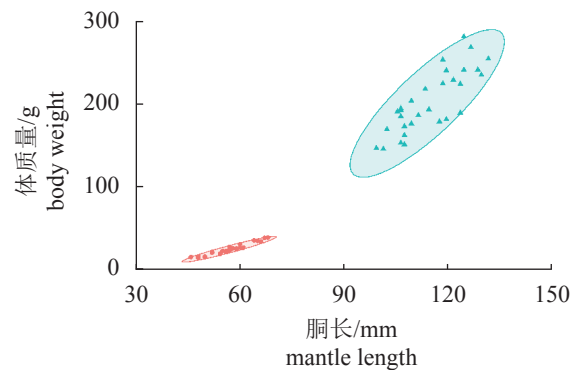


图 1 野生和养殖曼氏无针乌贼亲体胴长-体质量的置信椭圆

●. 养殖群体, ▲. 野生群体

Fig. 1 Confidence ellipse of mantle length and body weight of wild and hatchery-reared *S. japonica*

●. hatchery-reared group, ▲. wild group

### 2.2 野生和养殖曼氏无针乌贼亲体生化组分对比分析

通过肌肉、肝脏及卵巢的生化组分分析可以发现, 野生个体肌肉组织中的灰分含量显著高于养殖个体 ( $P < 0.05$ ), 脂肪含量显著低于养殖个体 ( $P < 0.05$ )。野生个体肝脏组织中的水分和灰分含量显著高于养殖个体 ( $P < 0.05$ ), 粗蛋白和粗脂肪含量显著低于养殖个体 ( $P < 0.05$ )。野生个体卵巢中的粗蛋白含量显著高于养殖个体 ( $P < 0.05$ ), 水分和灰分含量显著低于养殖个体 ( $P < 0.05$ ) (表 3)。



表3 野生和养殖曼氏无针乌贼亲体生化组分比较

Tab. 3 Comparison of biochemical composition between wild and hatchery-reared *S. japonica*

含量/%(湿重) content (wet weight)	肌肉 muscle		肝脏 liver		卵巢 ovary	
	野生 wild	养殖 hatchery-reared	野生 wild	养殖 hatchery-reared	野生 wild	养殖 hatchery-reared
水分 moisture	80.06±1.28 <sup>a</sup>	80.98±0.52 <sup>a</sup>	72.58±0.16 <sup>a</sup>	65.19±0.01 <sup>b</sup>	71.43±0.08 <sup>b</sup>	72.22±0.03 <sup>a</sup>
灰分 ash	1.55±0.08 <sup>a</sup>	0.45±0.03 <sup>b</sup>	1.98±0.15 <sup>a</sup>	1.21±0.11 <sup>b</sup>	2.50±0.02 <sup>b</sup>	2.89±0.06 <sup>a</sup>
粗蛋白 crude protein	16.52±0.82 <sup>a</sup>	15.94±0.46 <sup>a</sup>	17.20±0.54 <sup>b</sup>	21.94±0.17 <sup>a</sup>	19.53±0.14 <sup>a</sup>	18.36±0.09 <sup>b</sup>
粗脂肪 crude lipid	0.24±0.17 <sup>b</sup>	0.59±0.13 <sup>a</sup>	4.32±0.17 <sup>b</sup>	6.99±0.42 <sup>a</sup>	1.45±0.08 <sup>a</sup>	1.44±0.01 <sup>a</sup>

注: 同行数据上标不同字母表示野生和养殖2个群体间存在显著差异 ( $P<0.05$ )

Notes: different superscript letters in the same row represent significant differences between wild and hatchery-reared populations ( $P<0.05$ )

### 2.3 野生和养殖曼氏无针乌贼受精卵的比较

实验观察发现, 曼氏无针乌贼初产受精卵呈椭球状, 较柔软, 质地较光滑。随着胚胎发育时间的延长, 受精卵逐渐变小、变硬, 孵化后期卵会吸水膨胀, 卵膜逐渐变薄、变透明。受精卵胶质外膜的厚度为1~2 mm, 质量为0.01~0.03 g, 其中野生黑卵胶质外膜的厚度和质量均显著大于养殖卵 ( $P<0.05$ )。养殖白卵呈米黄色, 野生黑卵相比养殖黑卵色泽更深(图2)。处于卵裂期的养殖黑卵胚胎质量为(0.11±0.03) g, 与养殖白卵的胚胎质量(0.10±0.03 g)无显著差异 ( $P>0.05$ ), 野生黑卵的胚胎质量(0.19±0.02 g)显著大于养殖卵 ( $P<0.05$ ) (表4)。养殖黑卵和养殖白卵的长径和短径无显著差异 ( $P>0.05$ ), 野生黑卵的长径和短径均显著大于养殖卵 ( $P<0.05$ )。

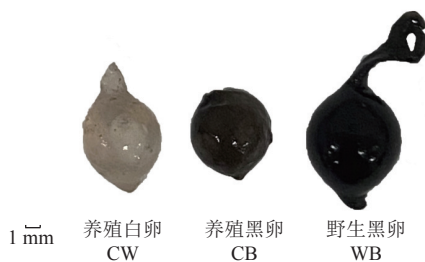


图2 曼氏无针乌贼初产受精卵

Fig. 2 Fertilized eggs of *S. japonica*

### 2.4 光照周期和胶质外膜对曼氏无针乌贼胚胎发育的影响

孵化率 在实验设定的光照周期下, 各处理组之间受精卵的孵化率存在显著差异 ( $P<0.05$ ) (图3)。养殖黑卵去膜组在24D条件下的孵化率显著高于在12D12L和24L条件下的孵化率 ( $P<0.05$ ), 而对照组在12D12L条件下的孵化率显著高于在24D和24L条件下的孵化率 ( $P<0.05$ )。养殖白卵对照组在24D和24L条件下的孵化率显著高于在

表4 野生和养殖对照组与去膜组卵裂期胚胎的形态学指标

Tab. 4 Morphological characteristics of the embryos under capsule layers depletion and normal conditions of wild and hatchery-reared fertilized eggs at cleavage stage

胚胎类型 embryonic type	胚胎质量/g embryos weight	长径/mm long diameter	短径/mm short diameter
养殖黑卵对照组 CBCG	0.11±0.03 <sup>b</sup>	8.39±0.85 <sup>b</sup>	5.39±0.91 <sup>c</sup>
养殖黑卵去膜组 CBDG	0.10±0.02 <sup>b</sup>	7.47±0.94 <sup>c</sup>	4.69±0.41 <sup>c</sup>
养殖白卵对照组 CWCG	0.10±0.03 <sup>b</sup>	8.16±0.79 <sup>b</sup>	5.17±0.48 <sup>c</sup>
养殖白卵去膜组 CWDG	0.10±0.02 <sup>b</sup>	7.58±0.85 <sup>c</sup>	5.16±0.50 <sup>c</sup>
野生黑卵对照组 WBCG	0.19±0.02 <sup>a</sup>	10.13±0.36 <sup>a</sup>	6.82±0.32 <sup>a</sup>
野生黑卵去膜组 WBDG	0.16±0.03 <sup>a</sup>	8.81±0.97 <sup>b</sup>	6.38±0.64 <sup>b</sup>

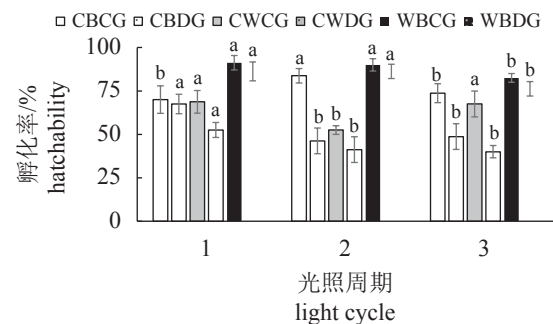


图3 光照周期和胶质外膜对曼氏无针乌贼不同类型受精卵孵化率的影响

1. 24 h 黑暗组, 2. 12 h 黑暗 12 h 光照组, 3. 24 h 光照组; 图柱上方的不同字母表示不同光照周期同一处理组间差异显著 ( $P<0.05$ ); 下同

Fig. 3 Effect of light cycle and capsule layer on the hatching rate of different fertilized egg of *S. japonica*

1. 24D, 2. 12D12L, 3. 24L; columns with different letters mean significantly difference in the same treatment within different light cycle groups ( $P<0.05$ ); the same below

12D12L条件下的孵化率 ( $P<0.05$ ), 而去膜组在24D条件下的孵化率显著高于在12D12L和24L条件下的孵化率 ( $P<0.05$ )。野生黑卵在24D和

12D12L 条件下的孵化率显著高于在 24L 条件下的孵化率 ( $P<0.05$ )。养殖亲体所产受精卵经去膜处理后, 孵化率显著低于对照组 ( $P<0.05$ ), 而野生亲体所产受精卵的去膜组孵化率虽有下降, 但与对照组之间无显著差异 ( $P>0.05$ )。

三因素方差分析结果表明, 光照周期、受精

卵类型和是否存在胶质外膜均极显著影响孵化率 ( $P<0.001$ ), 光照周期与受精卵类型、光照周期与是否存在胶质外膜、受精卵类型与是否存在胶质外膜均对孵化率的影响存在交互作用, 且光照周期、受精卵类型及是否存在胶质外膜三因素间也存在交互作用 (表 5)。

表 5 光照周期、受精卵类型和胶质外膜处理对曼氏无针乌贼胚胎的孵化率、孵化时间和初孵仔乌体质量与胴长的影响及其交互作用的三因素方差分析

Tab. 5 Effects of light cycle, egg type, capsule layer and their interactions on hatching rate, hatching time and mantle length and body weight of hatchlings of *S. japonica* based on Three-Way ANOVA

指标 parameter	显著性 (P值) significance (P value)							
	光照周期 light cycle	卵类型 egg type	胶质外膜 capsule layer	光照周期×卵类型 light cycle × egg type	光照周期×胶质外膜 light cycle × capsule layer	卵类型×胶质外膜 egg type × capsule layer	光照周期×卵类型×胶质外膜 light cycle×egg type×capsule layer	
孵化率 hatchability	***	***	***	***	***	***	***	
孵化时间 hatching time	***	***	**	NS	NS	NS	NS	
仔乌胴长 mantle length	NS	***	NS	***	NS	NS	NS	
仔乌体质量 body weight	NS	***	NS	***	NS	NS	NS	

注: NS. 无显著差异, \*. 差异显著( $P<0.05$ ), \*\*. 差异极显著( $P<0.01$ ), \*\*\*. 差异极其显著( $P<0.001$ )  
Notes: NS. no significant difference, \*. significant difference at  $P<0.05$ , \*\*. extremely significant difference at  $P<0.01$ , \*\*\*. extremely significant difference at  $P<0.001$

**孵化时间** 随着光照时间的延长, 曼氏无针乌贼受精卵的平均孵化时间具有先增加后减少的趋势 (图 4)。在本实验中, 12D12L 组的平均孵化时间最长; 相同光照、相同水温条件下, 养殖个体所产受精卵的平均孵化时间较野生个体的短。受精卵经去膜处理后, 平均孵化时间具有减少的趋势。由此可见, 光照周期和胶质外膜对曼氏无针乌贼的胚胎发育具有显著影响。

三因素方差分析结果表明, 光照周期、受精卵类型和是否存在胶质外膜对孵化时间存在单独效应 ( $P<0.01$ ), 但三因素间的交互作用均不显著 (表 5)。

**初孵仔乌的规格** 野生黑卵所孵化的仔乌规格显著大于养殖卵所孵化的仔乌 ( $P<0.05$ ), 养殖黑卵和白卵所孵化仔乌的规格无显著差异 ( $P>0.05$ )。野生黑卵所孵化的仔乌胴长和体质量整体离散度较大。光照周期和手工剥离胶质外膜对初孵仔乌的胴长和体质量均无显著影响 (图 5)。

对光照周期、受精卵类型和是否存在胶质外膜三因素进行方差分析, 结果显示, 受精卵类型对初孵仔乌的胴长和体质量存在单独效应 ( $P<0.001$ ),

仅光照周期和受精卵类型存在交互作用 ( $P<0.001$ ), 其他影响均不显著 (表 5)。

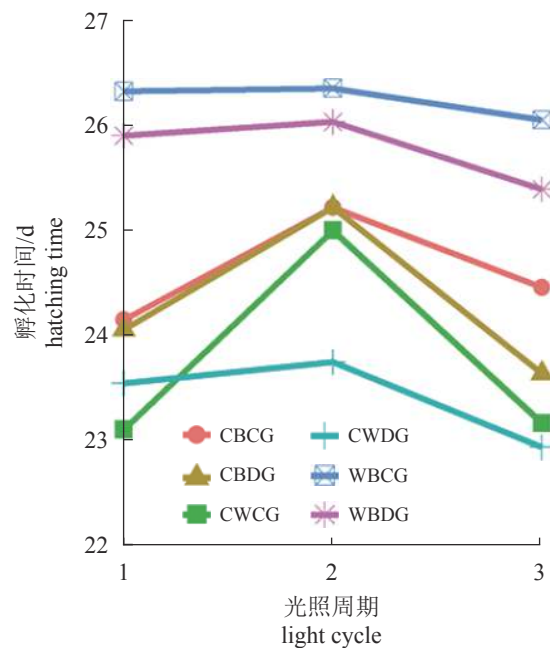


图 4 不同类型的受精卵在不同光照周期下的孵化时间  
Fig. 4 Hatching time of different fertilized eggs under different light cycles

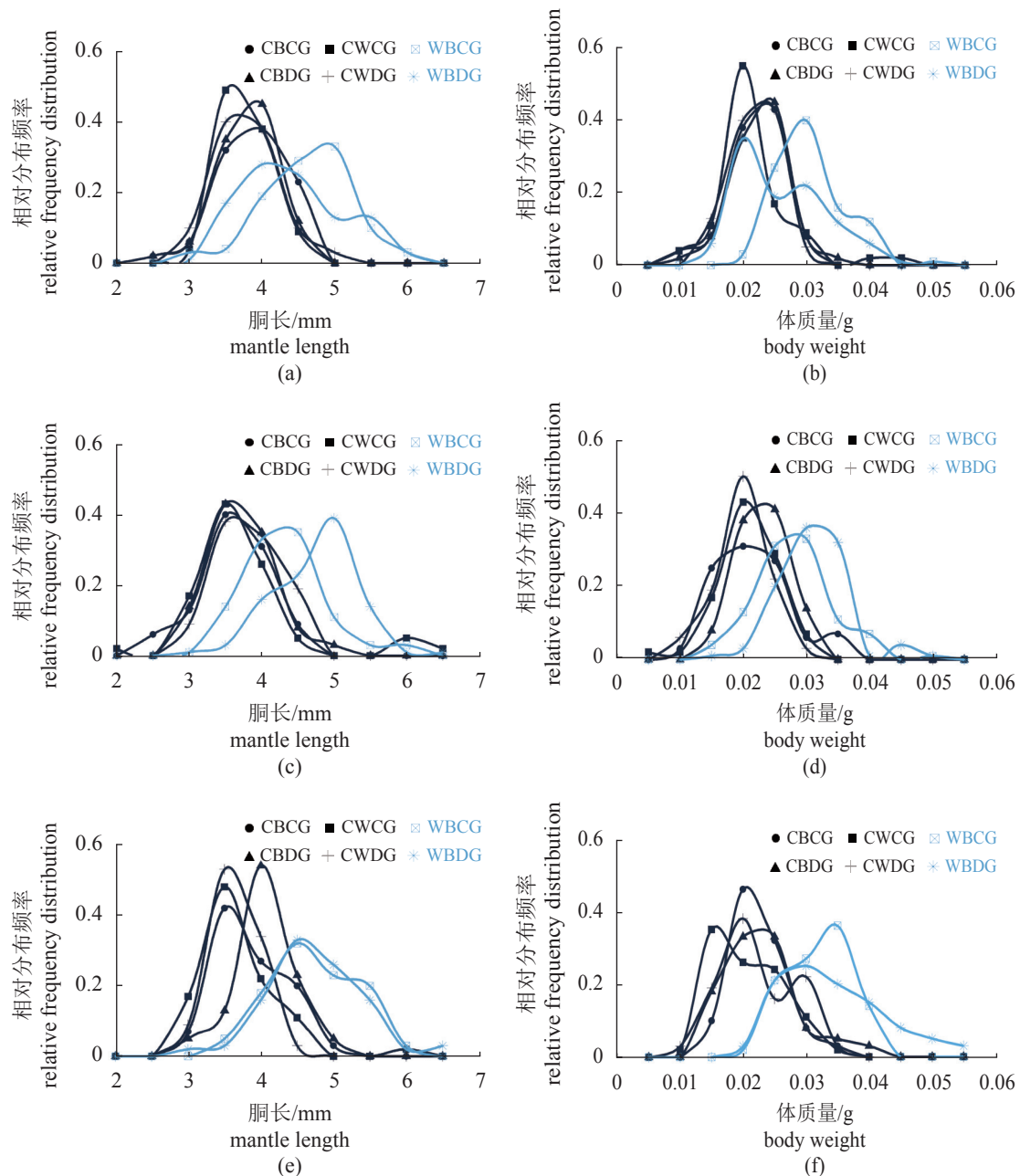


图5 初孵仔乌胴长、体质量正态分布图

(a)~(b) 24 h 黑暗组, (c)~(d) 12 h 黑暗 12 h 光照组, (e)~(f) 24 h 光照组

Fig. 5 Mantle length and body weight of hatchlings

(a)~(b) 24D, (c)~(d) 12D12L, (e)~(f) 24L

### 3 讨论

#### 3.1 野生和养殖曼氏无针乌贼亲体比较研究

在人工养殖环境下,动物的机体生化组分会与其野生同类存在较大差异<sup>[16]</sup>。Grigorakis等<sup>[17]</sup>研究了野生和养殖金头鲷(*Sparus aurata*)的生化组分差异,发现养殖个体的脂肪含量显著高于野生个体,其原因可能是养殖个体活动空间有限,运

动能量消耗降低。韩现芹等<sup>[18]</sup>比较了野生与养殖褐牙鲂(*Paralichthys olivaceus*)肌肉生化组分的差异,结果表明,养殖个体肌肉中脂肪质量分数约为野生个体的2倍,这与养殖环境和所投喂饵料密切相关。本研究中,养殖曼氏无针乌贼肌肉和肝脏中的粗脂肪含量均显著高于野生个体,野生个体卵巢中的粗蛋白含量显著高于养殖个体,分析其原因可能与实验个体摄食的饵料组分差异有

关。在自然海域中, 曼氏无针乌贼饵料组成复杂, 主要捕食小型鱼类、虾类、蟹类以及少量的软体动物<sup>[19]</sup>; 而养殖个体长期以海捕冰鲜虾为饵料, 且活动空间有限, 导致野生和养殖个体的生化组分在粗蛋白与粗脂肪含量上产生显著差异。

除了生化组分存在差异外, 野生和养殖曼氏无针乌贼在表观形态上也存在显著差异。本研究中, 野生群体的体质量、胴长和胴宽均显著大于养殖群体, 进一步证实了养殖曼氏无针乌贼存在个体小型化的现象<sup>[20]</sup>。研究表明, 水生生物形态特征受到遗传因子和环境因子的共同影响<sup>[21]</sup>, 由于本研究所用的养殖群体和野生群体均来自舟山海域, 基本可排除种群差异造成的个体小型化<sup>[22]</sup>。此外, 养殖条件下使用的增温措施也可能是导致曼氏无针乌贼性成熟时间提前、成熟个体规格较小的主要原因, 但具体机制还有待进一步研究。

### 3.2 受精卵胶质外膜的作用

对于缺少亲体护幼行为的卵生动物来说, 受精卵在产后往往会面临外界环境的各种不利胁迫<sup>[23]</sup>。以往研究表明, 受精卵的胶质外膜由多种蛋白质组成, 这些蛋白质通常为结构蛋白, 能够对受精卵起到保护作用<sup>[24]</sup>。在小点猫鲨 (*Scyliorhinus canicula*) 的受精卵中, 类似胶原蛋白的结构赋予了卵膜强度和弹性, 从而起到有效的机械保护作用<sup>[25]</sup>。海洋腹足类动物的卵膜具有类似角蛋白的结构蛋白, 不仅能够面对巨大的水流冲击<sup>[26]</sup>, 还能够避免细菌感染<sup>[27]</sup>。头足类动物的卵通常由胶质外膜所包裹<sup>[28]</sup>, 胶质外膜分为两层, 一层膜为亲体产卵时, 由输卵管腺分泌的黏多糖所形成; 另一层膜为当卵子释放到外套腔时, 由缠卵腺分泌物所形成<sup>[29]</sup>。胶质外膜的存在一定程度上能够避免胚胎直接暴露于外界环境中<sup>[30-31]</sup>, 在胚胎发育过程中起到一定的保护作用, 因此, 缺少黑色胶质外膜的保护可能会使胚胎更易受外界不利环境的影响, 甚至导致胚胎受损或死亡。在本研究 24D、12D12L 和 24L 光照条件下, 养殖亲体所产黑卵去膜组的孵化率显著降低; 在 24L 光照条件下, 野生亲体所产受精卵去膜组孵化率也呈现降低趋势, 进一步证实了黑色胶质外膜在胚胎发育过程中的遮光与保护作用。

尽管胶质外膜的存在有利于胚胎的正常发育, 但已有研究表明, 头足类受精卵胶质外膜的剥离有助于胚胎与外界环境之间的物质交换, 减少胚

胎孵化的时间<sup>[15]</sup>。本研究亦发现, 受精卵胶质外膜剥离后, 胚胎发育加快, 缩短了胚胎孵化的时间, 分析原因可能是由于去除胶质外膜的屏蔽作用后, 胚胎与外界环境之间氧气等物质交换速率加快, 新陈代谢速率也随之加快, 进而加快了仔乌破膜的进程。

### 3.3 光照周期对曼氏无针乌贼胚胎发育的影响

为了适应不同的环境, 许多生物能够根据外界环境控制其孵化速率, 这种现象被称为环境诱导孵化 (environmentally cued hatching)<sup>[32]</sup>, 其主要环境因素包括非生物因素, 如温度<sup>[32]</sup>、光照<sup>[33]</sup>、盐度<sup>[34]</sup>、溶解氧<sup>[35]</sup>, 以及生物因素, 如被捕食风险等<sup>[36]</sup>。在卵生生物中, 环境诱导孵化具有种间特异性, 可能导致提前孵化、延迟孵化或同步孵化<sup>[37]</sup>。已有研究表明, 在头足类动物的人工养殖过程中, 光照是影响其孵化能力和孵化时间的关键因素<sup>[38]</sup>。本研究发现, 12D12L 光照条件下的孵化时间较 24D 和 24L 2 个光照组有所延长, 实验发现, 此光照条件也最利于孵化缸内的硅藻生长, 受精卵卵膜表面附着了较多的硅藻, 可能阻碍了受精卵与外界环境的物质交换, 从而导致受精卵的平均孵化时间延长。本研究证实了光照周期对曼氏无针乌贼胚胎发育存在显著影响, 但有关其受精卵孵化的最适宜光照周期和光照强度等还应结合育苗水体的水质调控等进一步开展相关研究。

### 3.4 光照周期、胶质外膜和受精卵类型的交互作用对曼氏无针乌贼胚胎发育的影响

胚胎发育过程涉及一系列细胞分化、形态发生等过程, 易受外界环境因素的影响。以往的研究多集中在单因子对水生生物胚胎发育的影响<sup>[39-41]</sup>, 而对因子间的交互作用研究较少。本研究采用交互实验, 对光照周期、胶质外膜和受精卵类型的交互作用进行了显著性检验。结果表明, 三者之间的交互作用对胚胎孵化率影响显著 ( $P < 0.05$ ), 但对胚胎孵化时间影响不显著 ( $P > 0.05$ ), 分析原因可能是由于在胚胎发育过程中, 胶质外膜能够保护胚胎免受各种物理、化学和生物等外界环境因素的影响<sup>[42]</sup>, 即胶质外膜使卵具有了黏附性, 增加了卵的强度, 还能够阻挡光照, 减小光照对胚胎光感受器的刺激, 从而提高胚胎的孵化率。这也可能是因胶质外膜导致胚胎发育时间较长, 从而对其进行特殊保护的一种适应性进化。



## 4 结论

野生和养殖曼氏无针乌贼由于亲体规格、生化组分的显著差异,导致其所产受精卵的规格和孵化质量明显不同。大规模野生亲体所产受精卵的孵化质量高,仔乌个体更强壮。另外,短光照周期和黑色胶质外膜可使受精卵免受人工培育环境中的强光照射,保证了较高的孵化率。鉴于曼氏无针乌贼一年生的生活史特征,建议在放流苗种人工培育的过程中,尽量选用或补充大规模野生个体作为繁育亲本,同时对孵化池进行适当遮光处理,避免受精卵长时间暴露于过强的光照下,以提高受精卵的孵化率和仔乌成活率。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

### 参考文献 (References):

- [1] 董正之. 世界大洋经济头足类生物学 [M]. 济南: 山东科学技术出版社, 1991: 197-207.  
Dong Z Z. Biology of the economic species of Cephalopods in the world oceans[M]. Jinan: Shandong Science and Technology Press, 1991: 197-207 (in Chinese).
- [2] 吴常文, 董智勇, 迟长凤, 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* of Zhejiang, China[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2010, 41(1): 39-46 (in Chinese).
- [3] 唐逸民. 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.  
Tang Y M. 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).
- [4] 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[J]. 海洋与湖沼, 2009, 40(5): 590-595.  
Song W W, Wang C L. Genetic diversity of *Sepiella maindroni* in cultured and natural populations[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2009, 40(5): 590-595 (in Chinese).
- [5] 徐开达, 周永东, 王洋, 等. 浙北近海曼氏无针乌贼增殖放流效果评估[J]. 中国水产科学, 2018, 25(3): 654-662.  
Xu K D, Zhou Y D, Wang Y, et al. Effect and assessment of enhancement release of *Sepiella maindroni* in the northern coastal water of Zhejiang[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2018, 25(3): 654-662 (in Chinese).
- [6] 郑小东, 林祥志, 王昭凯, 等. 日本无针乌贼全人工养殖条件下生活史研究[J]. 海洋湖沼通报, 2010(3): 24-28.  
Zheng X D, Lin X Z, Wang Z K, et al. Studies on life cycle of cultured spineless cuttlefish *Sepiella japonica*[J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2010(3): 24-28 (in Chinese).
- [7] 叶素兰. 人工养殖曼氏无针乌贼繁殖生物学及生殖生物学研究 [D]. 杭州: 浙江工业大学, 2009.  
Ye S L. Studies on reproductive biology and spermiogenesis in cultured *Sepiella maindroni*[D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2009 (in Chinese).
- [8] 蒋霞敏, 陆珠润, 何海军, 等. 几种生态因子对曼氏无针乌贼野生和养殖卵孵化的影响[J]. 应用生态学报, 2010, 21(5): 1321-1326.  
Jiang X M, Lu Z R, He H J, et al. Effects of several ecological factors on the hatching of *Sepiella maindroni* wild and cultured eggs[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2010, 21(5): 1321-1326 (in Chinese).
- [9] Stuart K R, Drawbridge M. The effect of light intensity and green water on survival and growth of cultured larval California yellowtail (*Seriola lalandi*)[J]. *Aquaculture*, 2011, 321(1-2): 152-156.
- [10] Downing G, Litvak M K. Effects of light intensity, spectral composition and photoperiod on development and hatching of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) embryos[J]. *Aquaculture*, 2002, 213(1-4): 265-278.
- [11] 陈楠, 高雯, 张磊, 等. 水温、pH值和光照对斑马鱼受精卵孵化率的影响[J]. 水产养殖, 2016, 37(7): 27-31.  
Chen N, Gao W, Zhang L, et al. Effects of water temperature, pH and light on the hatching rate of zebrafish oosperm[J]. *Journal of Aquaculture*, 2016, 37(7): 27-31 (in Chinese).
- [12] 柳学周, 徐永江, 马爱军, 等. 温度、盐度、光照对半滑舌鳎胚胎发育的影响及孵化条件调控技术研究[J]. 海洋水产研究, 2004, 25(6): 1-6.  
Liu X Z, Xu Y J, Ma A J, et al. Effects of salinity, temperature, light rhythm and light intensity on embryonic



- development of *Cynoglossus semilaevis* Günther and its hatching technology optimization[J]. *Marine Fisheries Research*, 2004, 25(6): 1-6 (in Chinese).
- [13] 刘伟. 怀头鲂 *Silurus soldatovi* 早期发育生理生态学研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010.
- Liu W. Physio-ecology of northern sheatfish *Silurus soldatovi* during early development[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2010 (in Chinese).
- [14] Horwitz D W. Official methods of analysis of AOAC international[M]. 16th ed. Gaithersburg: Association of Official Analytical Chemists International, 1995: 1094.
- [15] 雷舒涵. 金乌贼胚胎与幼体发育生物学研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013.
- Lei S H. Studies on embryonic and larval development of golden cuttlefish (*Sepia esculenta*)[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2013 (in Chinese).
- [16] Domingues P, Sykes A, Sommerfield A, *et al.* Growth and survival of cuttlefish (*Sepia officinalis*) of different ages fed crustaceans and fish. Effects of frozen and live prey[J]. *Aquaculture*, 2004, 229(1-4): 239-254.
- [17] Grigorakis K, Alexis M N, Taylor K D A, *et al.* Comparison of wild and cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*); composition, appearance and seasonal variations[J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 2002, 37(5): 477-484.
- [18] 韩现芹, 贾磊, 王群山, 等. 野生与养殖牙鲆肌肉营养成分的比较[J]. *广东海洋大学学报*, 2015, 35(6): 94-99.
- Han X Q, Jia L, Wang Q S, *et al.* Composition of muscle nutrients between wild and cultured *Paralichthys olivaceus*[J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2015, 35(6): 94-99 (in Chinese).
- [19] 常抗美, 吴常文, 吕振明, 等. 曼氏无针乌贼(*Sepiella maindroni*)野生及养殖群体的生化特征及其形成机制的研究[J]. *海洋与湖沼*, 2008, 39(2): 145-151.
- Chang K M, Wu C W, Lü Z M, *et al.* Comparison in biochemistry of tissues of wild and cultured *Sepiella maindroni*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2008, 39(2): 145-151 (in Chinese).
- [20] 平洪领, 王天明, 刘立芹, 等. 光照周期对曼氏无针乌贼(*Sepiella japonica*)繁殖、性类固醇激素系统及生长性能的调控作用[J]. *海洋与湖沼*, 2015, 46(3): 577-584.
- Ping H L, Wang T M, Liu L Q, *et al.* Effect of photoperiod on reproduction, sex steroid hormone system and growth performance of cuttlefish *Sepiella japonica*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2015, 46(3): 577-584 (in Chinese).
- [21] Ihssen P E, Booke H E, Casselman J M, *et al.* Stock identification: materials and methods[J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1981, 38(12): 1838-1855.
- [22] 郭佳欣. 曼氏无针乌贼放流群体与野生群体的形态学、遗传学比较研究 [D]. 舟山: 浙江海洋大学, 2019.
- Guo J X. A comparative study on morphological and genetic between artificial releasing populations and wild populations of *Sepiella japonica*[D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2019 (in Chinese).
- [23] Lee Y C, Darmaillacq A S, Dickel L, *et al.* Effects of embryonic exposure to predators on the postnatal defensive behaviors of cuttlefish[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2020, 524: 151288.
- [24] Cornet V, Henry J, Goux D, *et al.* How egg case proteins can protect cuttlefish offspring?[J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0132836.
- [25] Thomason J C, Marrs S J, Davenport J. Antibacterial and antisetlement activity of the dogfish (*Scyliorhinus Canicula*) eggcase[J]. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 1996, 76(3): 777-792.
- [26] Rapoport H S, Shadwick R E. Mechanical characterization of an unusual elastic biomaterial from the egg capsules of marine snails (*Busycon* spp. ) [J]. *Biomacromolecules*, 2002, 3(1): 42-50.
- [27] Rawlings T. Direct observation of encapsulated development in muricid gastropods[J]. *The Veliger*, 1995, 38(1): 54-60.
- [28] Cronin E R, Seymour R S. Respiration of the eggs of the giant cuttlefish *Sepia apama*[J]. *Marine Biology*, 2000, 136(5): 863-870.
- [29] Boletzky S V. Encapsulation of cephalopod embryos—a search for functional correlations[J]. *American Malacological Bulletin*, 1986, 4(2): 217-227.
- [30] Martins C P P, Fernández-Álvarez F Á, Villanueva R. Invertebrate predation on egg masses of the European cuttlefish, *Sepia officinalis*: an experimental approach[J]. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 2018, 200: 437-448.
- [31] Bassaglia Y, Buresi A, Franko D, *et al.* *Sepia officinalis*: a new biological model for eco-evo-devo studies[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*,

- 2013, 447: 4-13.
- [32] Du W G, Shine R. The behavioural and physiological strategies of bird and reptile embryos in response to unpredictable variation in nest temperature[J]. *Biological Reviews*, 2015, 90(1): 19-30.
- [33] Gong Z J, Xie P, Li Y L. Effect of temperature and photoperiod on hatching of eggs of *Tokunagayusurika akamusi* (Tokunaga) (Diptera: Chironomidae)[J]. *Journal of Freshwater Ecology*, 2002, 17(1): 169-170.
- [34] Haramura T. Hatching plasticity in response to salinity levels in a rhacophorid frog inhabiting a coastal area[J]. *Journal of Zoology*, 2016, 299(2): 125-131.
- [35] Czerkies P, Brzuzan P, Kordalski K, *et al.* Critical partial pressures of oxygen causing precocious hatching in *Coregonus lavaretus* and *C. albula* embryos[J]. *Aquaculture*, 2001, 196(1-2): 151-158.
- [36] Atherton J A. The effect of parental and embryonic predator environments on offspring[D]. Townsville: James Cook University, 2015.
- [37] Doody J S. Environmentally cued hatching in reptiles[J]. *Integrative and Comparative Biology*, 2011, 51(1): 49-61.
- [38] Peng R B, Jiang X M, Jiang M W, *et al.* Effect of light intensity on embryonic development of the cuttlefish *Sepia lycidas*[J]. *Aquaculture International*, 2019, 27(3): 807-816.
- [39] 周爽男, 吕腾腾, 陈奇成, 等. 光照强度与光周期对虎斑乌贼胚胎发育的影响[J]. *应用生态学报*, 2018, 29(6): 2059-2067.
- Zhou S N, Lü T T, Chen Q C, *et al.* Effects of light intensity and photoperiod on the embryonic development of *Sepia pharaonis*[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2018, 29(6): 2059-2067 (in Chinese).
- [40] 彭瑞冰, 蒋霞敏, 于曙光, 等. 几种生态因子对拟目乌贼胚胎发育的影响[J]. *生态学报*, 2013, 33(20): 6560-6568.
- Peng R B, Jiang X M, Yu S G, *et al.* Effect of several ecological factors on embryonic development of *Sepia lycidas*[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2013, 33(20): 6560-6568 (in Chinese).
- [41] Peng R B, Wang P S, Jiang M W, *et al.* Effect of salinity on embryonic development of the cuttlefish *Sepia pharaonis*[J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2017, 48(4): 666-675.
- [42] 王双健, 丁玉惠, 周爽男, 等. 虎斑乌贼喷墨卵与正常卵的比较[J]. *水产学报*, 2017, 41(3): 366-373.
- Wang S J, Ding Y H, Zhou S N, *et al.* Comparison among inkjetting eggs and normal eggs of *Sepia pharaonis*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(3): 366-373 (in Chinese).

## Comparison between the wild and hatchery-reared *Sepiella japonica* in morphology, biochemical composition and embryonic development

ZHU Lanqian<sup>1</sup>, GUO Haoyu<sup>1,2</sup>, ZHANG Zonghang<sup>3</sup>, QIN Yilin<sup>1</sup>, SHI Huilai<sup>4</sup>, ZHANG Xiumei<sup>1,2\*</sup>

(1. School of Fishery, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China;

2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes,

Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266235, China;

3. The Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266100, China;

4. Marine Fishery Research Institute of Zhejiang Province, Zhoushan 316021, China)

**Abstract:** Hatchery-reared aquatic organisms usually have morphological and physiological differences compared to their wild conspecifics, which may have negative consequences the production of the juveniles under hatchery rearing conditions. To optimize the artificial breeding technologies of *Sepiella japonica*, we compared the morphology, biochemical composition and embryonic development between wild and hatchery-reared *S. japonica*. Furthermore, we also explored the effect of light cycle and capsule layer peeling on the embryonic development of *S. japonica*. The results showed that there were significant differences in morphological characteristics and biochemical components between wild and hatchery-reared *S. japonica*. The body sizes at maturity were much bigger in wild *S. japonica* than their hatchery-reared conspecifics. The lipid contents in muscle and liver of wild *S. japonica* were significantly lower than those of hatchery-reared. The protein contents in the ovary of wild *S. japonica* were significantly higher than those of hatchery-reared. The hatching rate of the black eggs spawned by the hatchery-reared cuttlefish was the highest when eggs were exposed to a 12 : 12-hours light : dark cycle. The hatching rate of the white eggs spawned by the hatchery-reared cuttlefish was the highest when eggs were exposed to the 24 hours dark cycle and 24 hours light cycle. The hatching rate of the black eggs spawned by the wild cuttlefish was the highest when eggs were exposed to the 24 hours dark cycle and 12 : 12-hours light : dark cycle. With the increasing light duration, the hatching period of fertilized eggs showed a tendency that it first increased and then decreased, which indicated that light cycle was an important factor for the development of embryo. With egg capsule layer peeling, the fertilized eggs from hatchery-reared *S. japonica* showed a significant decreased hatching rate, and the hatching time showed a decreasing tendency. To improve the hatching rate of the fertilized eggs and the survival rate of hatchlings, it is important to add sufficient number of wild brood-stock into productive group during artificial breeding and seedling production programs. Moreover, low light intensity should be implemented during the incubation of the fertilized eggs, which may improve the hatching rate and the survival rate of hatchlings. This study could provide useful information for the optimization of artificial breeding technology of *S. japonica*.

**Key words:** *Sepiella japonica*; apparent morphology; biochemical composition; capsule layer; light cycle; embryonic development

**Corresponding author:** ZHANG Xiumei. E-mail: xiumei1227@163.com

**Funding projects:** National Key R & D Program of China (2019YFD0901303); Zhejiang Province Key R & D Program Project (2021C02047); Research Program of Bureau of Science and Technology of Zhoushan (2020C43255)