

金乌贼荧光标志方法的研究

郝振林, 张秀梅, 张沛东, 董晓煜, 卞晓东

(中国海洋大学教育部海水养殖重点实验室, 山东 青岛 266003)

摘要: 建立一种简单实用的标志方法,对更好地评价金乌贼增殖放流效果和渔业资源现状非常重要。以金乌贼为实验对象,利用荧光物质—茜素络合指示剂(Alizarin Complexone, ALC)浸泡金乌贼幼体,对其内壳进行标志,所用荧光染色剂浓度为 $(6.0\sim 8.0)\times 10^{-3}\%$,浸泡染色时间24 h。将标志组和对照组的金乌贼幼体分别暂养于 $1.5\text{ m}\times 1.5\text{ m}\times 1.5\text{ m}$ 水泥池30 d,后将暂养的幼体放养于面积为 $2\ 667\text{ m}^2$ 的室外土池,并在60 d后,将平均胴背长达 91.4 mm (对照组)、 87.6 mm (标志组)金乌贼幼体移入室内水泥池越冬,整个实验历时210 d。实验期间,分别在标志后15、30、45、60、90、210 d对金乌贼进行随机取样,解剖出内壳观察标志色保留状况并对金乌贼生长发育及存活率进行测量。结果显示,标志金乌贼的成活率为100%;方差分析显示,标志组和对照组金乌贼的生长发育差异不显著($P>0.05$);210 d后内壳骨针部仍清晰保留初染时的半椭圆形淡紫色圆圈;实验所采用的ALC内壳标志方法操作简单,可一次性大量进行标志处理,鉴别简单,无需借助其它仪器,肉眼便可直接观察到标志色,并且标志色保持率高,保留时间长,是一种理想的标志金乌贼的方法。

关键词: 金乌贼;标志;荧光染色剂;保持率

中图分类号: S965.3

文献标识码: A

鱼类标志放流(tagging)是指将天然捕获或人工培育的生物体做上标记后放入自然水域,然后根据标志放流记录和重捕记录,绘制出鱼类标志放流和重捕的分布图,推测鱼类游动的方向、路线、范围和速度等,并可进一步结合鱼体长度、重量和年龄资料,研究鱼类的生长和死亡规律,以及检验增殖放流的效果等^[1-4]。

目前,国内外使用的标志方法主要是挂牌标志法、剪鳍标志法、烙印标志法、化学物质标志法、线码标志法、生物遥测标志法等^[5]。

综观上述标志方法,鱼体外部挂牌、剪鳍、烙印标志法不仅会对鱼体造成较大伤害,且外部标识容易脱落、消失,导致对鱼类回捕的推算产生较大误差。生物遥测标记法也只适用于大型鱼类的追踪调查。因此,建立一种有效的标志方法和回

捕技术是准确评价增殖放流效果的技术保障。

目前,国内外尚未见有关乌贼标志放流方面的报道。本文以金乌贼为实验对象,利用荧光染色剂—茜素络合指示剂(ALC)对金乌贼的内壳进行标志,并对标志后的金乌贼幼体进行暂养,暂养过程中,定期对标志金乌贼进行随机取样,解剖出内壳观察标志色保留状况并对金乌贼生长发育及存活率进行了测量和分析。

1 材料与方法

1.1 材料

苗种的来源、规格 2006年5月从山东省日照市岚山头采集金乌贼受精卵2378粒,在山东省海渔水产良种引进开发中心的 $1.5\text{ m}\times 1.5\text{ m}\times 1.5\text{ m}$ 水泥池内进行人工孵化,孵化水温 $22\sim$

收稿日期:2007-10-22

资助项目:国家科技支撑计划(2006BAD09A15),山东省科技发展计划项目(2004GG2205110)

作者简介:郝振林(1980-),男,山东青岛人,博士研究生,从事金乌贼增殖生态学研究。E-mail:haozhenlin@126.com

通讯作者:张秀梅,Tel:0532-82032076, E-mail:gao zhang@ouc.edu.cn

25℃、盐度(30±0.3),实验用海水为经砂滤池过滤的天然海水。孵化后15d,选取胴背长8.0~10.0mm(平均9.1mm)体格健壮的金乌贼幼体用于标志实验。

荧光染色剂 所用染色剂为茜素络合指示剂,黄色粉末,易溶于水,水溶液呈赤红色,英文名 Alizarin Complexone,简称 ALC,化学名 3-[N,N-Bis(carboxymethyl)aminomethyl]-1,2-dihydroxyanthraquinone,分子式 C₁₉H₁₅NO₁₈。

1.2 方法

染色时间与染色剂浓度 将海水中染色剂的质量百分比浓度设为 2.0×10⁻³%、4.0×10⁻³%、6.0×10⁻³%、8.0×10⁻³%、10.0×10⁻³% 5个梯度,每个梯度的染色剂中放入金乌贼幼体25尾,分别经染色2、5、8、12、24h后随机取样3尾,解剖出内壳,荧光显微镜下观察内壳着色情况。实验水温26~28℃、盐度(30±0.3),染色前1d停止投饵,染色过程中不投饵。

批量染色实验 根据染色时间与染色剂浓度实验结果,确定最佳染色时间及染色剂浓度分别为24h,(6.0~8.0)×10⁻³%,并将70尾金乌贼幼体用于批量染色实验。

样品采集及数据处理 将70尾标志金乌贼(标志组)和88尾未标志金乌贼(对照组)分别暂养于2个1.5m×1.5m×1.5m水泥池内,实验期间每天10:00、16:00各投饵一次,饵料为捕获于海边的活体小鱼和小虾。30d后将其放养于面积为2667m²的天然土池,此时金乌贼幼体主要利用土池中的室外饵料,不需投饵。放养60d后于2006年11月将金乌贼移至室内水泥池越冬,实验历时210d。

暂养过程中,分别于染色后15、30、45、60、90、210d进行随机取样,每次取5尾,测量金乌贼生长发育状况(主要测量胴背长、胴长、胴宽、壳长、壳宽、内壳轮层最后一层宽度、轮层数、胴宽/胴长、壳宽/壳长等生物学指标),存活率以及观察金乌贼内壳标志色保留状况。

所有实验数据用SPSS 10.0等软件处理。

2 结果

2.1 最佳染色时间及染色剂的浓度

结果显示,当海水中染色剂的质量百分比浓度为(6.0~8.0)×10⁻³%,染色24h,金乌贼内壳着

色效果较佳,此时金乌贼内壳呈肉眼可见的淡紫色;荧光显微镜下可见内壳出现亮红色(图版-1)。其它浓度和染色时间条件下,金乌贼内壳着色效果欠佳,荧光显微镜下亮红色不明显或者亮红色过强。

2.2 存活率

在整个染色实验过程中,均未发现金乌贼幼体死亡现象,存活率达100%。

2.3 标志色的保持时间及保持率

分别在染色后15、30、45、90、210d进行随机取样,每次5尾,解剖取其内壳观察标志色退色情况。结果发现,其骨针部在染色210d后仍清晰保留初染时的半椭圆形淡紫色圆圈且标志色可以透过金乌贼薄而透明的皮肤直接观察到,标志明显,肉眼易于分辨(图版-2~4);荧光显微镜下染色部呈亮红色,新长出的部分则无亮红色荧光,标志色保持率达100%。

2.4 生长发育

染色后15~30d标志组与对照组金乌贼生长缓慢,标志15d后标志组与对照组金乌贼平均胴背长分别为9.0mm、9.5mm,30d时为17.8mm、20.0mm;标志后30~90d时标志组与对照组金乌贼生长迅速,到90d时标志组与对照组金乌贼平均胴背长分别为87.6mm、91.4mm,90~210d时标志组与对照组金乌贼生长速度又变得缓慢,210d时标志组与对照组金乌贼平均胴背长分别为111.4mm、115.8mm(图1-a)。用SPSS 10.0软件对标志组与对照组金乌贼胴背长进行*t*检验,结果差异不显著($P>0.05$);另外,标志组与对照组金乌贼的其它生物学指标(胴长、胴宽、壳长、壳宽、轮层数、内壳最后一层宽度)与胴背长的生长具有相似的变化趋势(图1-b~i),分别进行*t*检验,结果显示,两组间差异均不显著($P>0.05$);此外,胴宽/胴长、壳宽/壳长的比值随生长时间变化如图1-h~i,经*t*检验显示,差异也均不显著($P>0.05$)。

2.5 其它部位着色状况

解剖镜下观察发现,除内壳能着色外,金乌贼腕部及触腕穗的吸盘也能着色。染色剂浓度为(6.0~8.0)×10⁻³%,染色8~12h时,吸盘便由无色变为肉眼可见的淡紫色(图版-4),荧光显微镜下呈亮红色荧光,但标志色保持时间较短,标志后3~5d后便会退色。

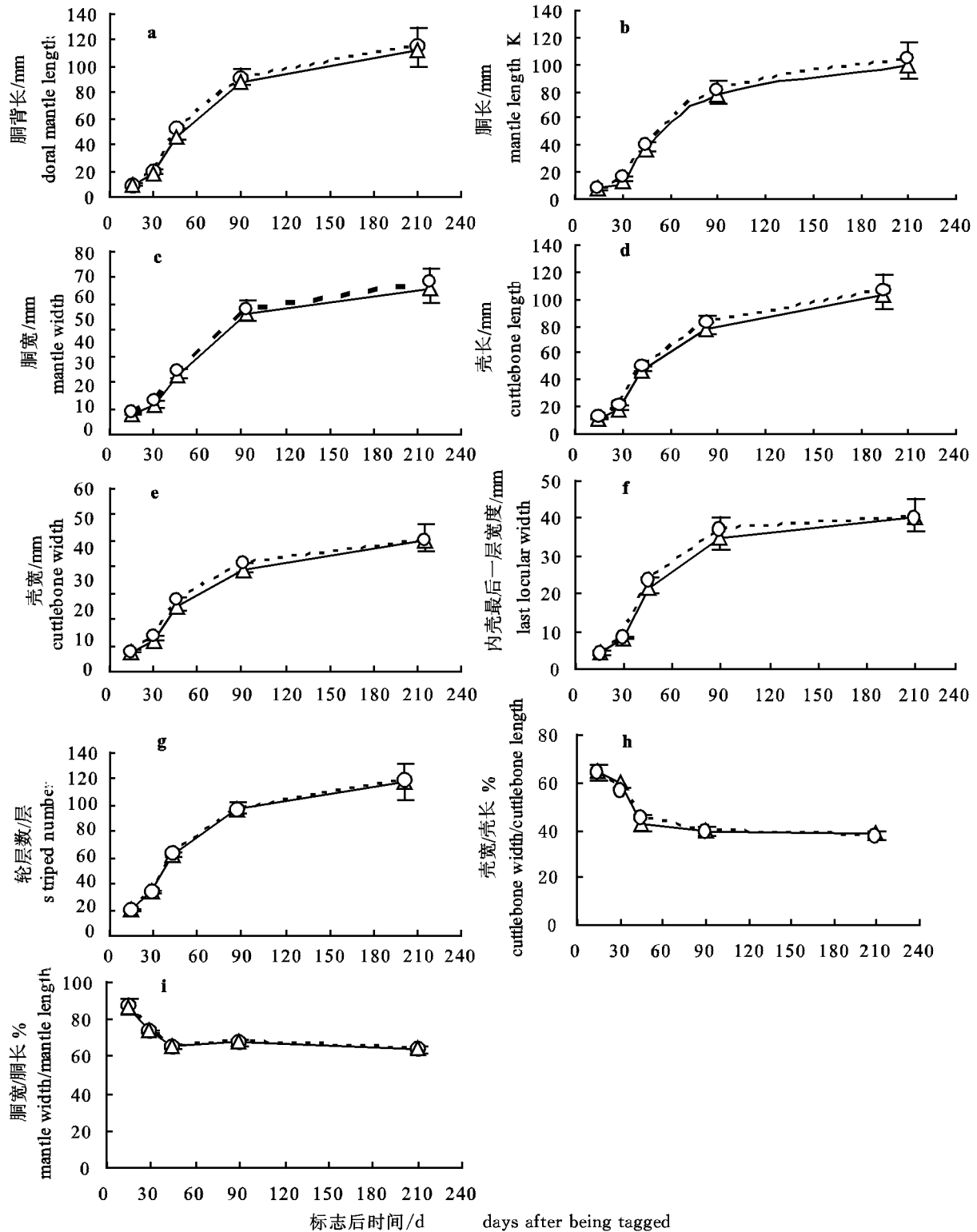


图1 标志后金乌贼各生物学指标的变化

a. 胴背长、b. 胴长、c. 胴宽、d. 壳长、e. 壳宽、f. 内壳最后一层宽度、g. 轮层数、h. 壳宽/壳长、i. 胴宽/胴长。(.....○.....对照组, —△— 标志组)
注: 数据柱代表平均值, 误差线是平均值的标准偏差

Fig. 1 Change of biological index in *S. esculenta* after being tagged

a. dorsal mantle length, b. mantle length, c. mantle width, d. cuttlebone length, e. cuttlebone width, f. last locular width, g. striped number, h. cuttlebone width / cuttlebone length, i. mantle width / mantle length. (.....○..... control group, —△— tagged group)
Notes: Data are means and error bars are S. D. of the means

3 讨论

3.1 标志效果

关于鱼类荧光标志报道较多,许多学者认为荧光色素的保持率与鱼种有关。Weber 等^[6]通过药物注射、喂养试验鱼或将鱼体直接浸泡在药物溶液中,发现荧光物质可以在钙化层沉积,保持时间为 3.5 年;在其它鱼类实验中,标志色可保持 5~24 个月^[7-10];Crook 等^[11]将荧光物质注入点南乳鱼(*Galaxias truttaceus*)的前鳃盖骨,结果发现,标志后 4 d 和 131 d 的保持率分别为 100% 和 92%;Willis 等^[12]用此种方法标志了金赤鲷(*Agurus auratus*),两个星期后,发现保持率达 92%;Pierson 等^[13]的实验表明斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)经标志后 387 d,荧光物质保持率为 93%,罗非鱼(*Tilapia mossambica*)经 110 d,保持率为 78%,草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)经过 238 d,保持率为 80%,但鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)经过 174 d,保持率为 0^[13];Frenette 等^[14]将荧光色素注射到克氏鲱(*Salmo calrki*)和玛红点鲑(*Salvelinus rnalma*)的脂眼眼里,结果 17 个月后的保持率分别为 95% 和 89%;对于同样的标志部位,虹鳟(*Salmo gairdneri*)标志 29 d 后的保持率为 96.1%^[15],湖红点鲑(*Lake rnalma*)294 d 后的保持率却为 41%^[16],Catalano 等^[17]研究了荧光物质在大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)和蓝鳃太阳鱼(*Lepomis macrochirus*)两种大规模鱼类的应用效果,主要比较了注入式发光染料(injectable photonic dyes, IPDs)在大口黑鲈鳍条中的保持时间,结果发现存在很大差异。

Mouring 等^[18]认为荧光色素可见标志的保持率除与鱼种有关外,可能还受标志个体大小的影响,并通过实验发现个体较大的虹鳟的保持率比个体较小的明显偏高。笔者认为,不同学者所报道的荧光标志保持率的差异性,除了与鱼种和个体大小有关外,可能还与所用荧光染色剂的种类和标志方法有关。

本研究结果显示,标志 210 d 后金乌贼内壳骨针部仍清晰保留初染时的半椭圆形淡紫色圆圈(图版-2,3),标志明显,肉眼易于分辨,标志色保持率为 100%。另外,由于金乌贼的皮肤薄而透明,无需解剖内壳,也可透过皮肤明显观察到内壳骨针部

的标志色。使内部染色也具备了外部可视的直观效果(图版-4)。荧光显微镜下标志部仍呈亮红色,新长出的部分无亮红色。另外实验还发现,除内壳能着色外,金乌贼腕部和触腕穗的吸盘也能着色,只是标志色保持时间较短仅为 3~5 d。分析认为,金乌贼进食时不断的用腕部和触腕穗摄取食物,导致吸盘在摄食过程中受到磨损而退色,此外,在生长发育过程中,也可能由于触腕吸盘上的角质圈是不断更新的,因而会产生短期退色现象。

3.2 生长发育

不同标志方法对标志对象的生长和存活率影响不同。Phinney 等^[19]比较了荧光标志法与剪鳍标志法对银大马哈鱼(*Oncorhynchus kisutch*)的标志效果,结果发现荧光标志组的成活率比剪鳍组高 25%,而且生长速度也略优于剪鳍组;Pierson 等^[13]的实验表明,荧光标志法与剪鳍标志法不仅对斑点叉尾鲷和罗非鱼的标志保持率无显著差异,而且成活率也没有显著差别,但对于草鱼,荧光组的存活率(61%)显著低于剪鳍组(99%);Fujihara 等^[20]认为用同种染料,不同处理方式,也可影响标志鱼的存活率,实验发现,将荧光材料俾斯麦棕 Y 注射入鲮科鱼类皮下,30 h 后实验鱼全部死亡,但通过浸泡、投喂等方法,存活率均为 100%。

本实验结果显示,在整个染色实验过程中,均未发现标志金乌贼死亡现象,存活率达 100%,即本实验所用的荧光染色剂—茜素络合指示剂(ALC)对金乌贼幼体的成活率无影响。

通过对标志组与对照组金乌贼进行不定期取样、测量、分析发现,标志组与对照组金乌贼生长发育差异不显著($P > 0.05$),即茜素络合指示剂(ALC)对金乌贼的生长发育无影响。另外,图 1-a~i 还显示,标志后 30~90 d 金乌贼的生长速度明显高于标志后 15~30 d 及 90~210 d。分析认为标志后前 30 d 金乌贼暂养于室内水泥池中,投喂的饵料主要是活糠虾,饵料单一,营养缺乏,所以生长缓慢;标志后 30~90 d 金乌贼被放养于面积为 2 667 m² 的室外土池,此时水体较大,活动空间广,主要摄食池中天然饵料,营养充足故生长较快;其后,由于水温降低,在标志后 90~210 d,移入室内水泥池越冬,此时海水温度由 28 ℃ 降到 13 ℃ 左右,金乌贼摄食量下降,加之实验后期纤毛虫病的影响导致金乌贼生长减缓。

本实验采用的标志金乌贼的方法操作容易,

鉴别简单,可一次性大量进行染色处理,标志色保持率高、保留时间长,填补了国内外在金乌贼标志技术方面的空白,是一种理想的标志金乌贼的方法。

参考文献:

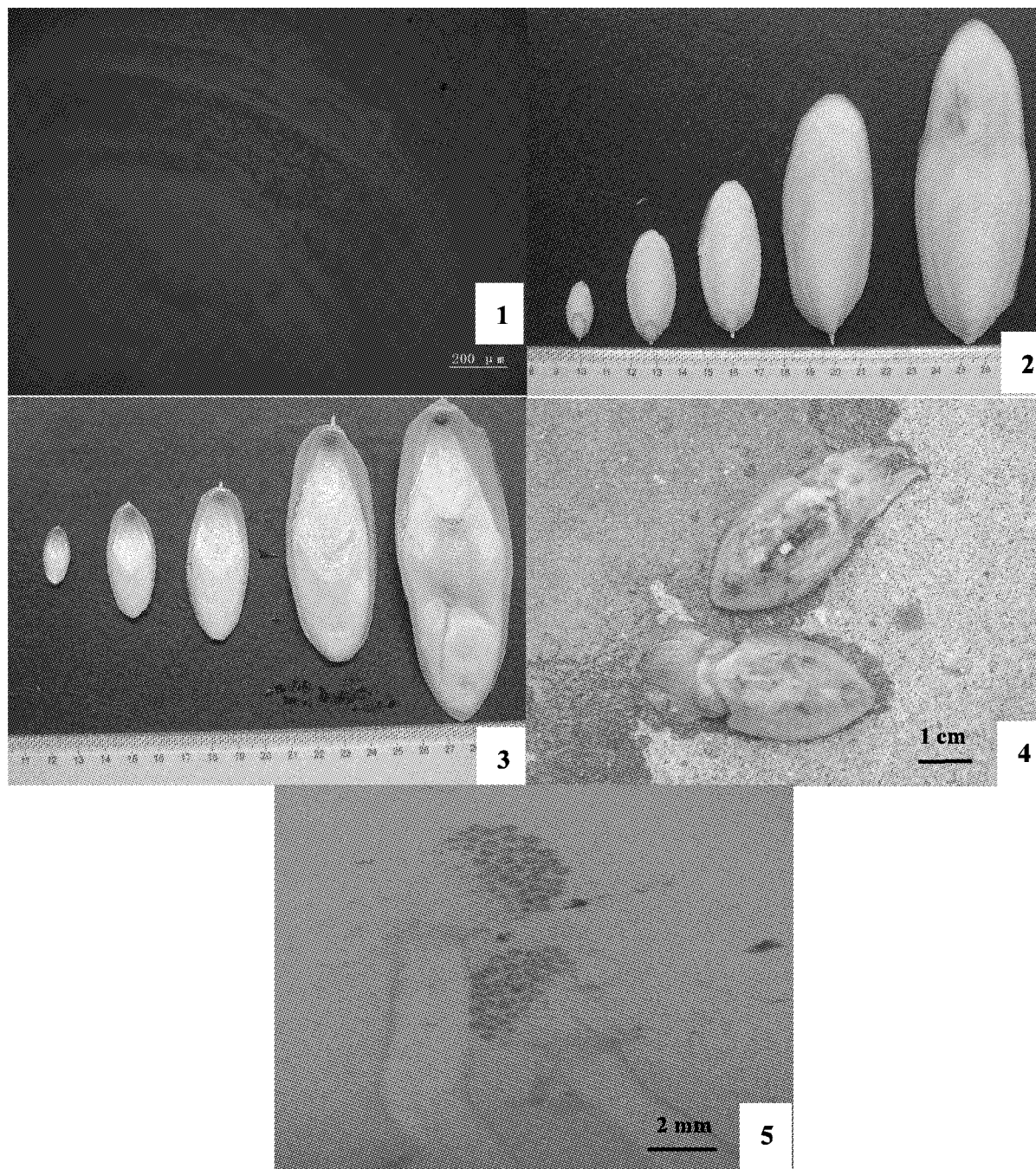
- [1] 林元华. 海洋生物标志放流技术的研究状况[J]. 海洋科学, 1985, 9(5): 54-58.
- [2] 林龙山, 丁峰元, 程家骅. 运用 POP-UP TAG 对金枪鱼进行标志放流几个值得注意的问题[J]. 现代渔业信息, 2005, 20(2): 17-19.
- [3] Ricker W E. Methods for assessment of fish production in freshwater [M]. IMP Handbook No. 3, Oxford: Blackwell Science Publication, 1971: 82-97.
- [4] Nielsen L A. Methods of marking fish and shellfish [M]. New York: American Fisheries Society Special Publication, 1992, 23: 37-38.
- [5] 张堂林, 李钟杰, 舒少武. 鱼类标志技术的研究进展[J]. 中国水产科学, 2003, 10(3): 246-253.
- [6] Weber D, Ridgway G J. Marking Pacific salmon with tetracycline antibiotics [J]. J Fish Res Bd Can, 1967, 24 (4): 849-865.
- [7] Tsukamoto K. Mass-marking of ayu eggs and larvae by tetracy-tagging of otoliths [J]. Bull Jap Soc Sci Fish, 1985, 51: 903-911.
- [8] Behrene Y S, Mulligan T J. Marking nonfeeding salmonid fry with dissolved strontium [J]. Can J Fish Aquat Sci, 1987, 44: 1502-1506.
- [9] Bilfon H T. Marking chum salmon fry vertebrae with oxytetracycline [J]. North American Journal of Fisheries Management, 1986, 6: 126-128.
- [10] Loreon R D, Mudrak V A. Use of tetracycline to mark otoliths of American shad fry [J]. North American Journal of Fisheries Management, 1987, 7: 453-455.
- [11] Crook D A, White R W. Evaluation of subcutaneously implanted visual implant tags and coled wire tags for marking and begin recovery in a small scaleless fish, *Galaxias truttaceus* (Pisces: Galaxiidae) [J]. Marine and Freshwater Research, 1995, 46 (6): 943-946.
- [12] Willis T J, Babcock R C. Retention and *in situ* detectability of visible implant fluorescent elastomer (VIFE) tags in *Pagrus auratus* (Sparidae) [J]. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research, 1998, 32: 247-254.
- [13] Pierson J M, Bayne D. Long-term retention of fluorescent pigment by four fishes used in warmwater culture [J]. Prog Fish-Cult, 1983, 45(3): 186-188.
- [14] Frenette B J, Bryand M D. Evaluation of visible implant tags applied to wild coastal cutthroat trout and dolly varden in Margaret Lake, Southeast Alaska [J]. North American Journal of Fisheries Management, 1996, 16: 926-930.
- [15] Hale R S. Retention and defecation of coded wire tags and elastomer tags in trout [J]. North American Journal of Fisheries Management, 1998, 18: 197-201.
- [16] Kincaid H L, Catkins G T. Retention of visible implant tags in lake trout and Atlantic salmon [J]. Prog Fish-Cult, 1992, 54: 163-170.
- [17] Catalano M J, Chipps S R, Bouchard M A. Evaluation of injectable fluorescent tags for marking centrarchid fishes: Retention rate and effects on vulnerability to predation [J]. North American Journal of Fisheries Management, 2001, 21 (4): 911-917.
- [18] Mouring T E, Fausch K D, Gowan C. Comparison of visible implant tags and Ploy anchor tags on hatchery rainbow trout [J]. North American Journal of Fisheries Management, 1994, 14: 636-642.
- [19] Phimey D E, Matthew S B. Field test of fluorescent pigment marking and fin clipping of coho salmon [J]. J Fish Res Bd Can, 1969, 26(6): 1619-1624.
- [20] Fujihara M P, Nakatani R E. Cold and mild heat marking of fish [J]. Prog Fish-Cult, 1967, 29(3): 172-174.

Fluorescent marking method in golden cuttlefish *Sepia esculenta* (Cephalopoda: Sepiidae)

HAO Zhen-lin, ZHANG Xiu-mei, ZHANG Pei-dong, DONG Xiao-yu, BIAN Xiao-dong
(Key Laboratory of Mariculture, Ocean University of China, Ministry of Education, Qingdao 266003, China)

Abstract: It is very important to establish a kind of simple and useful marking method to evaluate multiplication and releasing effect and the current situation of fisheries resources. The golden cuttlefish were chosen to be the study material in this article. The larval golden cuttlefish hatched after 15 d were immersed in $(6.0 - 8.0) \times 10^{-3} \%$ alizarin complexone (ALC) for 24 h. The tagged group and control group were reared in $1.5 \text{ m} \times 1.5 \text{ m} \times 1.5 \text{ m}$ indoor pond for 30 d, and then they were removed to $2\ 667 \text{ m}^2$ outdoor pond. After 60 d, their mean dorsal mantle length grew to 91.4 mm (control group) and 87.6 mm (tagged group) respectively, they were removed to indoor pond for over winter. During 210 d experiment, the golden cuttlefish were sampled randomly in order to examine the growth and the dye-retention of the tagged cuttlebone after being tagged 15,30,45,60,90,210 d. The results of the experiment showed that this marking method is very effective, and the survival rate of the tagged golden cuttlefish is 100%. There are no significant differences between the growth of the tagged group and the control group ($P > 0.05$). The half tagged lavender ring is very clear in the cuttlebone even after being tagged 210 d. Additionally, according to this method, we could tag lots of samples easily at a time, and the retention of marker can last a long period. Due to the maneuverability and easy to distinguish tagged ones, it is suggested that this method could be a good marking method for golden cuttlefish.

Key words: *Sepia esculenta*; marking; fluorescent dye; retention



图版 Plate

1. 荧光显微镜下内壳的照片, 染色剂浓度 $(6.0 \sim 8.0) \times 10^{-3} \%$, 染色 24 h; 2. 标志后 15、30、45、90、210 d 内壳的正面观; 3. 标志后 15、30、45、90、210 d 内壳的腹面观; 4. 标志后 30 d 金乌贼照片; 5. 解剖镜下吸盘的照片, 染色剂浓度 $(6.0 \sim 8.0) \times 10^{-3} \%$, 染色 12 h

1. The cuttlebone photo of fluorescent microscope when $(6.0 - 8.0) \times 10^{-3} \%$ and dyed 24 h. 2. The obverse view of cuttlebone after tagged 15, 30, 45, 90, 210 d. 3. The ventral view of cuttlebone after tagged 15, 30, 45, 90, 210 d. 4. The *S. esculenta* photo after tagged 30 d. 5. The acetabula photo of light microscope when $(6.0 - 8.0) \times 10^{-3} \%$ and dyed 12 h