

曼氏无针乌贼荧光染色标志方法研究

梁 君, 王伟定*, 徐汉祥, 周永东, 徐开达

(浙江省海洋水产研究所农业部重点渔场渔业资源科学观测实验站, 浙江省海水增养殖重点实验室,
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 316100)

摘要: 建立一种高效的标志方法, 为更加准确地评价曼氏无针乌贼增殖放流的效果提供技术保障。以曼氏无针乌贼为试验对象, 利用茜素络合物(ALC)浸泡曼氏无针乌贼幼体, 对其内壳进行标志。设置 5 个浓度梯度组和 2 个时间段, 测量并观察曼氏无针乌贼胴背长、体质量及存活率。将试验组与对照组各 50 尾饲养于直径 2.5 m 的圆形水泥池内, 分别在染色后 5、12、19、26 d 进行随机取样并对标志曼氏无针乌贼进行高温处理 5 min, 解剖出内壳观察标志色保留状况。最佳染色剂浓度和浸染时间分别为 90 mg/L 和 24 h; 曼氏无针乌贼胴背长和体质量呈极显著正相关 ($P < 0.01$), 试验组与对照组曼氏无针乌贼的生长发育差异不显著 ($P > 0.05$); 26 d 后内壳标志色依然清晰保留初染时的椭圆形粉红色, 高温处理前、后着色部位的范围和颜色均未发生变化。ALC 荧光染色标志法兼具体内标志和外部可见的双重效果, 标志曼氏无针乌贼的存活率和标志色保持率均为 100%。结果表明本方法简单高效, 能进行批量标志处理, 是一种理想的曼氏无针乌贼标志方法, 具有广阔的应用前景。

关键词: 曼氏无针乌贼; 荧光染色; 标志; 保持率; 存活率

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

标志放流是研究水生生物分布规律、估算自然种群数量和评估人工增殖放流效果的重要手段之一^[1-2]。国外水生生物的标志方法很多, 对于经济价值较高或生命周期较长的鱼类, 主要采用被动整合雷达标(passive integrated transponder tag, PIT)、档案式标(archival tag)、分离式卫星定位标(POP-UP tag)以及生物遥测标(biotelemetric tag)等; 而对于个体较小的鱼类, 主要采用内植可视橡胶标(visible implant elastomer tag, VIE tag)和编码金属线标(coded wire tag, CWT)^[3]。洪波等^[3]将除 VIE tag 之外的标志方法均划归体内标志法。体内标志法虽具有良好的应用和发展前景, 但因其设备昂贵, 标志费用高, 在国内应用较少, 国内仍偏重于应用传统的标志方法^[4-5]。因此, 有必要开展新型标志方法的探索, 建立高效的标志方法可为更加准确地评价增殖放流的效果提供技术保障。

曼氏无针乌贼(*Sepiella japonica*)曾是我国传统的四大海产之一。20 世纪 70 年代末以来, 由于拖网、张网等多种渔具大量捕捞幼乌贼和越冬乌贼, 致使曼氏无针乌贼由生长型过度捕捞向补充型过度捕捞转变, 破坏了渔业资源的生态平衡, 导致浙江渔场的曼氏无针乌贼资源近乎枯竭^[6]。自 2006 年以来, 浙江沿海开展了曼氏无针乌贼受精卵和幼体的大规模增殖放流^[7]。了解人工放流的乌贼卵和幼体的存活及分布情况, 对曼氏无针乌贼的增殖放流效果评价至关重要。放流群体的回捕率高低是评价增殖放流效果的主要指标^[8], 而高效的标志方法和回捕率存在直接的关系。

茜素络合物(alizarin complexone, ALC)是目前国内外荧光标志的常用化学物质, 主要用于鱼类的受精卵或者耳石的标志。日本对香鱼

收稿日期:2012-11-20 修回日期:2013-03-20

资助项目:海洋公益性行业科研专项(201005013, 200905019);公益性行业(农业)科研专项(201003068);浙江省海洋经济和渔业新兴产业补助项目(浙海渔计[2012]146号);浙江省科技厅科研院所专项(2012F30015)

通信作者:王伟定, E-mail:wdwang@sohu.com

(*Plecoglossus altivelis*) 卵^[9]、大马哈鱼 (*Oncorhynchus keta*) 发眼卵^[10]、牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)^[11] 等进行浸泡染色, Stewart 等^[12] 对澳大利亚东南部 3 种鱈科 (*Hemiramphidae*) 鱼类进行染色, 西班牙也开展了斑带重牙鲷 (*Diplodus vulgaris*) 和尖吻重牙鲷 (*Diplodus puntazzo*)^[13] 的浸泡染色研究。国内进行了鳗 (*Elopichthys bambusa*)^[14]、重口裂腹鱼 (*Schizothorax davidi*)^[15]、胭脂鱼 (*Myxocyprinus asiaticus*)^[16]、稀有鮡鲫 (*Gobiocypris rarus*) 和彭泽鲫 (*Carassius auratus*)^[17] 等淡水鱼的浸泡染色试验研究, 杨德国等^[1] 采用 ALC 浸泡的方法对海水洄游性中华鲟 (*Acipenser sinensis*) 的胸鳍和背骨板部位进行标志, 对海水鱼类的浸泡染色仅见郝振林等^[18] 对金乌贼 (*Sepia esculenta*) 的报道, 董智勇等^[19] 则对曼氏无针乌贼采用背部注射法。本研究以曼氏无针乌贼为试验对象, 利用 ALC 对曼氏无针乌贼的内壳进行浸染标志, 旨在探索一种新型的标志方法, 为曼氏无针乌贼的标志放流及效果评估提供参考。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验用苗种系自行繁育的 F₂ 代曼氏无针乌贼幼体, 饲养于舟山市西轩岛实验场直径 2.5 m, 高 1.5 m 的圆形水泥池内。水泥池内水温 25 ~ 27 °C, 盐度 (30 ± 0.5), 试验用水为经砂滤池过滤的天然海水。选取胴背长为 (8.7 ± 0.5) mm 体格健壮的曼氏无针乌贼幼体用于标志试验。染色剂 ALC 来自于日本株式会社同仁化学研究所, 黄棕色粉末, 无毒, 微溶于水, 易溶于碱水, 分子式 C₁₉H₁₅NO₈, 配制的染色液 pH 值为 8.3。

1.2 实验方法

预备试验设置 分别采用气石充氧和充氧袋充氧结扎的方法进行密度暂养预备试验, 发现在连续气石充氧 24 h 无染色液条件下, 2 L 水体暂养 8 尾曼氏无针乌贼可行, 为安全尾数; 在充氧袋结扎 24 h 无染色液条件下, 2 L 水体暂养 20 尾曼氏无针乌贼为安全尾数。此外, 在气石充氧的条件下, 2 L 水体放入 5 尾曼氏无针乌贼, 分别在 ALC 染液浓度为 120、150 和 180 mg/L 时观察曼氏无针乌贼的反应, 24 h 后发现 150 mg/L 的玻璃水缸内仅死亡 1 尾, 但是喷墨严重, 缸底杂质较多,

180 mg/L 的玻璃水缸内曼氏无针乌贼全部死亡。

浓度梯度试验设置 参考国内外 ALC 染色液的浓度设置, 均介于 50 ~ 350 mg/L^[9-19], 根据预备试验结果, 将染色液的浓度设为 0 (空白组)、60、90、120、150 mg/L 5 个浓度梯度, 浸泡染色时间为 12 和 24 h。染色前 1 d 停止投饵, 染色过程不投饵, 染色后根据 12 和 24 h 2 个不同时间段, 从每个浓度梯度组挑选出 12 尾曼氏无针乌贼, 分装在 10 个干净的泡沫箱中进行暂养观察。由于曼氏无针乌贼具有趋向弱光的特性^[20], 实验环境四周用黑布帘围遮。泡沫箱容积 125 L, 内注水维持 2/3, 采用气石充氧, 每个泡沫箱侧面近底部外接直径 1 cm 的细管用于换水和排污。

暂养期为 24 d, 期间日换水 1 次, 每 3 天对泡沫箱进行清洗并消毒。为避免乌贼幼体相互残杀^[21], 保证充足饵料, 每天 08:30、14:30 和 20:30 各投饵 1 次, 饵料以活糠虾为主 (胴背长 25 mm 以下^[22]), 配合投喂鲜活小虾。试验期间水温 24.5 ~ 27.5 °C, 盐度 (30 ± 0.5)。暂养期结束后, 各浓度梯度组 2 个时间段均随机取样 3 尾, 解剖出内壳, 用 75% 酒精固定, 在实验室进行显微观察。

批量染色试验 根据染色时间与染色液浓度梯度试验结果, 确定最佳染色时间及染色液浓度分别为 24 h 和 90 mg/L。将 50 尾曼氏无针乌贼幼体 (试验组) 用于批量染色试验, 毗邻相同水泥池内也放入 50 尾未标志曼氏无针乌贼进行对照试验, 试验历时 26 d。暂养过程中, 分别于染色后 5、12、19、26 d 进行随机取样, 每次取样 5 尾, 测量曼氏无针乌贼的胴背长和体质量, 并观察其内壳标志色保持状况。

后期高温试验 选取 10 尾批量试验结束后的标志曼氏无针乌贼, 模拟餐饮流程, 放入煮沸的锅内进行高温处理 5 min, 取出样品后等待至温度适宜, 在实验室显微观察内壳标志色保持状况。30 d 后, 再次观察内壳标志色保持状况。

样品及数据处理 样品均在实验室进行解剖、观察, 使用 NIKON SME1000 显微镜外接电脑, 通过 ACT-2U 软件进行图片拍摄。利用 Excel 2007 及 SPSS 19.0 软件对所有数据进行统计处理。

2 结果与分析

2.1 最佳染色时间及染色液浓度

试验结果表明, 在染色时间为 12 和 24 h, 浓

度大于 60 mg/L 时,曼氏无针乌贼的内壳均着色明显,肉眼可见内壳呈粉红色或亮红色。暂养 24 d 后,不同浓度下 24 h 浸泡染色着色效果见图版-1,可见染色液的浓度 90 mg/L 为着色效果的分界值,着色效果并未随着染色液的浓度升高而增加。

2.2 标志效果与保持率

分别于染色后 5、12、19、26 d 进行随机取样,每次取样 3 尾,解剖取其内壳观察标志色褪色情况。结果发现,26 d 后内壳标志色依然清晰,幼体标志时形成的粉红色内壳的轮廓依然完整且透过背部表皮肉眼可见(图版-2)。解剖后,肉眼观察内壳正、反面着色区与新生出的白色部分区别明显,荧光显微镜下观察着色区呈亮红色,未发现褪色现象,标志保持率为 100%。

2.3 存活率

浓度梯度试验过程中,12 和 24 h 的 0、60、90

mg/L 组均未发现乌贼死亡现象,存活率达 100%。而 12 h 120 mg/L 组死亡率为 8.3%,24 h 120 mg/L 组和 12 h 150 mg/L 组死亡率均为 25%,24 h 150 mg/L 组死亡率高达 33%。批量染色试验结果发现试验组和对照组均未出现死亡现象。

2.4 生长发育

分别于染色后 5、12、19、26 d 进行随机取样,测量其胴背长和体质量的变化情况(图 1)。对批量染色试验和浓度梯度试验的曼氏无针乌贼进行回归分析,结果发现胴背长(Y)和体质量(X)呈显著正相关。试验组: $Y = 0.007X^2 - 0.084X + 0.289$ ($n = 56, R^2 = 0.986, P < 0.01$);对照组: $Y = 0.006X^2 - 0.057X + 0.116$ ($n = 56, R^2 = 0.981, P < 0.01$)。批量染色试验组与对照组曼氏无针乌贼胴背长和体质量分别没有显著差异(t test, $P = 0.84; P = 0.81$)。

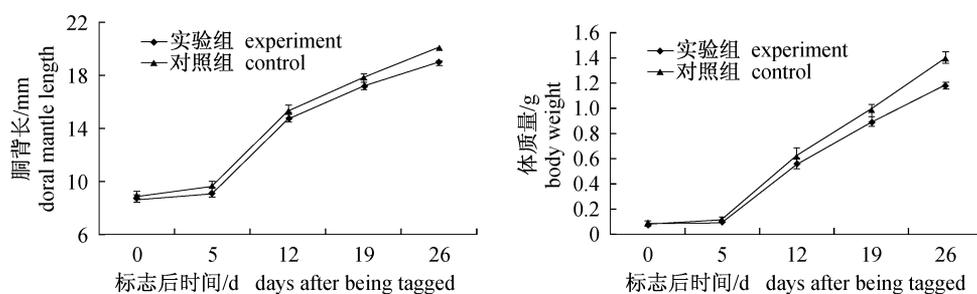


图 1 标志后曼氏无针乌贼对照组与试验组胴背长和体质量的变化

Fig. 1 Change of the dorsal mantle length and body weight of *S. maindroni* after being tagged

2.5 其他部位着色情况

解剖镜下观察发现,除了内壳能着色外,曼氏无针乌贼内部组织、腕部及触腕穗的吸盘等部位均能着色。染色剂浓度为 90 mg/L,持续染色 8 h,内部组织便由无色变为肉眼可见的淡红色(图版-3),但标志色保持时间较短,标志后 2~4 d 后便消失。

2.6 高温处理

显微镜下观察经高温处理后的曼氏无针乌贼,发现内壳标志色仍然明显,处理前后着色部位的范围和颜色未发生变化(图版-4)。30 d 后显微镜观察依然清晰保留初染时的颜色。

3 讨论

3.1 标志效果

张堂林等^[23]提出体外标志技术中的颜料标

志主要包括刺纹、染料注射、染色(浸染和口服)、液体橡胶浆注射、荧光颜料标志等,体内标志技术中的化学标志包括元素标志和荧光标志 2 种方法。本研究选用 ALC 荧光染色标志法,利用 ALC 在曼氏无针乌贼内壳钙化层的沉积作用使标志色能够长久保持而不褪色。由于曼氏无针乌贼表皮薄而透明,因此无需解剖或借助其它仪器设备便可直接观察到。因此,ALC 荧光染色标志法兼具体外标志和体内标志的双重效果。

国内外关于水生动物浸泡染色研究进行了诸多报道。许多学者认为浸泡染色的保持率与鱼种类有关。Weber 等^[24]将太平洋鲑(*Oncorhynchus* spp.)直接浸泡在药物溶液中,发现荧光物质可在钙化层沉积保持时间为 3.5 年;而香鱼幼体^[25]、大西洋鲑(*Salmo salar*)^[26]、美洲鲟(*Alosa sapidissima*)^[27]等标志色可保持 5~24 月。此外,

染色标志的保持率与标志部位、标志方法,标志对象个体大小、染色剂种类和荧光颜料的粒径等因素有关^[18-19,24-28]。Pauly 等^[29]用 3 种荧光标志方式标志全长 50 ~ 60 mm 的硬头鳟 (*Salmo gairdneri*),喷枪方式保持时间为 90 d,浸泡方式保持 27 d 以上,而涂刷方式保持不到 3 d。本研究采用浸泡方式对曼氏无针乌贼幼体进行标志,内壳标志色 26 d 后依然清晰可见,保持率为 100%,而内部组织、腕部及触腕穗的吸盘等部位仅 2 ~ 4 d 后便完全失去标志色,研究结果与郝振林等^[18]用 ALC 浸泡标志金乌贼一致。

将本研究结果与董智勇等^[19]用注射法标志曼氏无针乌贼和郝振林等^[18]用浸泡法标志金乌贼的结论进行比较,发现最佳浓度下,3 个标志试验的存活率和标志色保持率相同,均为 100%。曼氏无针乌贼最佳浸泡浓度 90 mg/L 与金乌贼的 60 ~ 80 mg/L 相近,但是外部观察粉红色内壳与金乌贼的淡紫色圆圈有较大区别,与经注射处理后曼氏无针乌贼的紫红色相近,分析原因可能与配制 ALC 溶液时碱液加入多少有关,当 ALC 水溶液在 pH 值小于 6 时为黄色,在 6 与 10 之间为红色,大于 11 时为蓝紫色。此外,本研究结果与董智勇等^[19]提出的 ALC 浸染方法无法对无针乌贼内壳进行着色标志的结论有些出入,分析认为其所配制的 ALC 水溶液 pH 值介于 10 ~ 11 之间,而紫色为红色和蓝色的混合色,碱液浓度过高可能是导致董智勇等^[19]提出此结论的重要原因。Secor 等^[30]认为低龄鱼比高龄鱼有更高的代谢率,浸泡标志时吸收荧光物质更多一些。董智勇等^[19]试验的乌贼个体较大(董智勇等^[19]平均胴背长 27 mm,本研究 8.7 mm 和郝振林等^[18] 9.1 mm)也可能是导致着色不明显的原因之一。因此,本实验建议从放流存活率、生产成本和染色成本上考虑,大个体乌贼的标志染色适合于进行背部注射,放流小规格时适合于进行染色标志。

3.2 生长发育

Mcfarlane 等^[31]认为外部标志可能会影响鱼类的存活、习性和生长。裸头鱼 (*Anoplopoma fimbria*) 在标志后的 7 年中生长速度降低^[31],经标志的北极红点鲑 (*Salvelinus alpinus*) 与对照组相比死亡率增加^[32],某些鱼在标志后表现出异常的行为^[33]。但是国内外对于浸泡染色标志对水生动物生长发育和存活率的影响进行了诸多正面

报道。Pierson 等^[34]试验表明,荧光标志法与剪鳍标志法不仅对斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*) 和罗非鱼 (*Tilapia mossambica*) 的标志保持率无显著差异,而且存活率也没有显著差别。Pauly 等^[28]研究发现使用喷枪、涂刷和浸泡 3 种荧光标志方式标志硬头鳟时存活率均为 100%,喷枪标志法经过 7 h 适应期后开始摄食,浸泡标志法和涂刷标志法对硬头鳟的摄食无影响。Liu 等^[35]利用 ALC 和茜素红对牙鲆进行浸泡染色,发现 72 h 处理过程中均未见死亡,60 d 后观察 ALC 试验组死亡率为 0,茜素红试验组死亡率为 6.33%,但是两种染色剂对牙鲆的生长基本没有影响。同时也有研究指出,同种染料的不同标志处理方式(如浸泡与注射等)也是影响标志对象存活率的重要因素^[36]。

本试验结果表明,试验组与对照组个体的生长发育差异不显著,说明 ALC 对内壳进行标志的方法不影响曼氏无针乌贼的生长发育;在最佳染色浓度和时间下,浓度梯度染色和批量染色均未发现乌贼死亡现象,说明 ALC 对曼氏无针乌贼幼体的存活率无影响。研究结论与郝振林等^[18]用浸泡法标志金乌贼和董智勇等^[19]用注射法标志曼氏无针乌贼的研究结果一致。

3.3 应用前景

荧光染色标志法适用于曼氏无针乌贼的标志,具有操作简单,标志色保持率高、保留时间长、容易识别等优点。本研究是在气石充氧条件下进行,若在实践中使用纯氧,可进行大批量标志处理。在标志放流后,无需解剖或借助其它仪器设备能在自然海区快速分辨并回捕经 ALC 浸泡染色的标志个体。曼氏无针乌贼生命周期仅 1 年,亲体在完成产卵后基本死亡^[7]。利用曼氏无针乌贼的这一生理特性,便于每年进行增殖放流效果评价和比较,区别于黑鲷 (*Sparus macrocephalus*)、日本黄姑鱼 (*Nibea japonica*) 等品种的经济正效应需要多年累积^[8]。此外,根据曼氏无针乌贼内壳经高温处理着色部位的范围和颜色不变的特性,可进行餐桌上回收的大胆猜想,如果进行适当宣传,并制定合理的回收对策,将对利用回捕率来评价曼氏无针乌贼增殖放流效果意义重大,具有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] 杨德国,危起伟,王凯,等. 人工标志放流中华鲟幼鱼的降河洄游[J]. 水生生物学报, 2005, 29(1):

- 26 - 30.
- [2] 陈锦辉,庄平,吴建辉,等.应用弹式卫星数据回收标志技术研究放流中华鲟幼鱼在海洋中的迁移与分布[J].中国水产科学,2011,18(2):437 - 442.
- [3] 洪波,孙振中.标志放流技术在渔业中的应用现状及发展前景[J].水产科技情报,2006,33(2):73 - 76.
- [4] 周永东,徐汉祥,戴小杰,等.几种标志方法在渔业资源增殖放流中的应用效果[J].福建水产,2008(1):6 - 12.
- [5] 陈锦淘,戴小杰.鱼类标志放流技术的研究现状[J].上海水产大学学报,2005,14(4):451 - 456.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 梁君,王伟定,林桂装,等.浙江舟山人工生境水域日本黄姑鱼和黑鲷的增殖放流效果及评估[J].中国水产科学,2010,17(5):1075 - 1084.
- [9] Tsukamoto K. Otolith tagging of ayu embryo with fluorescent substances[J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1988,54(8):1289 - 1295.
- [10] Kawamura H, Kudo S, Miyamoto M, et al. Otolith marking with fluorescent substances at eyed-egg stage of chum salmon[R]//NPAFC technical report NO. 3. Seattle: International Workshop on Salmonid Otolith Marking, 2001:6 - 8.
- [11] Yamashita Y, Nagahora S, Yamada H, et al. Effects of release size on survival and growth of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in coastal waters of Iwate Prefecture, Northeastern Japan [J]. Marine Ecology Progress Series, 1994,105:269 - 276.
- [12] Stewart J, Hughes J M. Age validation and growth of three commercially important hemiramphids in south-eastern Australia[J]. Journal of Fish Biology, 2007, 70(1):65 - 82.
- [13] Villanueva R, Moli B. Validation of the otolith increment deposition ratio using alizarin marks in juveniles of the sparid fishes, *Diplodus vulgaris* and *D. puntazzo* [J]. Fisheries Research, 1997, 30(3):257 - 260.
- [14] 宋昭彬,曹文宣.鳃鱼仔稚鱼耳石的标记和其日轮的确证[J].水生生物学报,1999,23(6):677 - 682.
- [15] 何春林,付自东,严太明,等.用荧光物质浸泡标记重口裂腹鱼仔鱼耳石[J].四川动物,2008,27(3):331 - 334.
- [16] 付自东,李静,岳碧松,等.用荧光物质浸泡标记胭脂鱼仔、稚鱼耳石[J].动物学杂志,2005,40(4):60 - 65.
- [17] 欧阳斌,常剑波.荧光物质浸泡标记稀有鮠鲫和彭泽鲫仔、稚鱼[J].水生生物学报,1999,23(4):324 - 329.
- [18] 郝振林,张秀梅,张沛东,等.金乌贼荧光标志方法的研究[J].水产学报,2008,32(4):577 - 583.
- [19] 董智勇,吴常文,叶德锋.曼氏无针乌贼荧光标记技术初步研究[J].浙江海洋学院学报:自然科学版,2010,29(2):120 - 128.
- [20] 郑美丽,肖金华,郑微云,等.曼氏无针乌贼的趋光特性[J].厦门大学学报:自然科学版,1980,19(3):91 - 99.
- [21] 苏跃中,周瑞发,刘振勇,等.曼氏无针乌贼规模化全人工育苗技术初探[J].水产科技情报,2011,38(5):219 - 226.
- [22] 郭新,范广钻,邦国生.浙江近海曼氏无针乌贼食性的初步研究[J].浙江水产学院学报,1986,5(2):171 - 175.
- [23] 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.
- [24] Weber D, Ridgway G J. Marking pacific salmon with tetracycline antibiotics [J]. Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 1967,24(4):849 - 865.
- [25] Tsukamoto K. Mass marking of ayu eggs and larvae by tetracycline-tagging of otoliths[J]. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 1985,51:903 - 911.
- [26] Mohler J W. Producing fluorescent marks on Atlantic salmon fin rays and scales with calcein via osmotic induction[J]. North American Journal of Fisheries Management, 2003,23(7):1108 - 1113.
- [27] Lorson R D, Mudrak V A. Use of tetracycline to mark otoliths of American shad fry [J]. North American Journal of Fisheries Management, 1987,7(3):453 - 455.
- [28] Phinney D E, Miller D M, Dahlberg M L. Mass-marking young salmonids with fluorescent pigment [J]. Transactions of the American Fisheries Society, 1967,96(2):157 - 162.
- [29] Pauly G B, Troutt D A. Comparison of three methods of fluorescent dye application for marking juvenile steelhead[J]. Transactions of the American Fisheries Society, 1988,117(3):311 - 313.
- [30] Secor D H, White M G, Dean J M. Immersion marking of larval and juvenile hatchery-produced

- striped bass with oxytetracycline [J]. Transactions of the American Fisheries Society, 1991, 120(2): 261 – 266.
- [31] Mcfarlane G A, Beamish R J. Effect of an external tag on growth of sablefish (*Anoplopoma fimbria*), and consequences to mortality and age at maturity [J]. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 1990, 47(8): 1551 – 1557.
- [32] Berg O K, Bery M. Effects of carlin tagging on the mortality and growth of anadromous Arctic Char, *Salvelinus alpinus* (L.) [J]. Aquaculture and Fisheries Management, 1990, 21(2): 221 – 227.
- [33] Matthews K R, Reavis R H. Underwater tagging and visual recapture as a technique for studying movement patterns of rockfish [J]. American Fisheries Society Symposium, 1990, 7: 168 – 172.
- [34] Pierson J M, Bayne D R. Long-term retention of fluorescent pigment by four fishes used in warmwater cultures [J]. The Progressive Fish-Culturist, 1983, 45(3): 186 – 188.
- [35] Liu Q, Zhang X M, Zhang P D, Nwafili S A. The use of alizarin red S and alizarin complexone for immersion marking Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* (T.) [J]. Fisheries Research, 2009, 98(1): 67 – 74.
- [36] Deacon J E. A staining method for marking large numbers of small fish [J]. The Progressive Fish-Culturist, 1961, 23(1): 41 – 42.

A fluorescent staining method for marking the cuttlefish (*Sepiella japonica*)

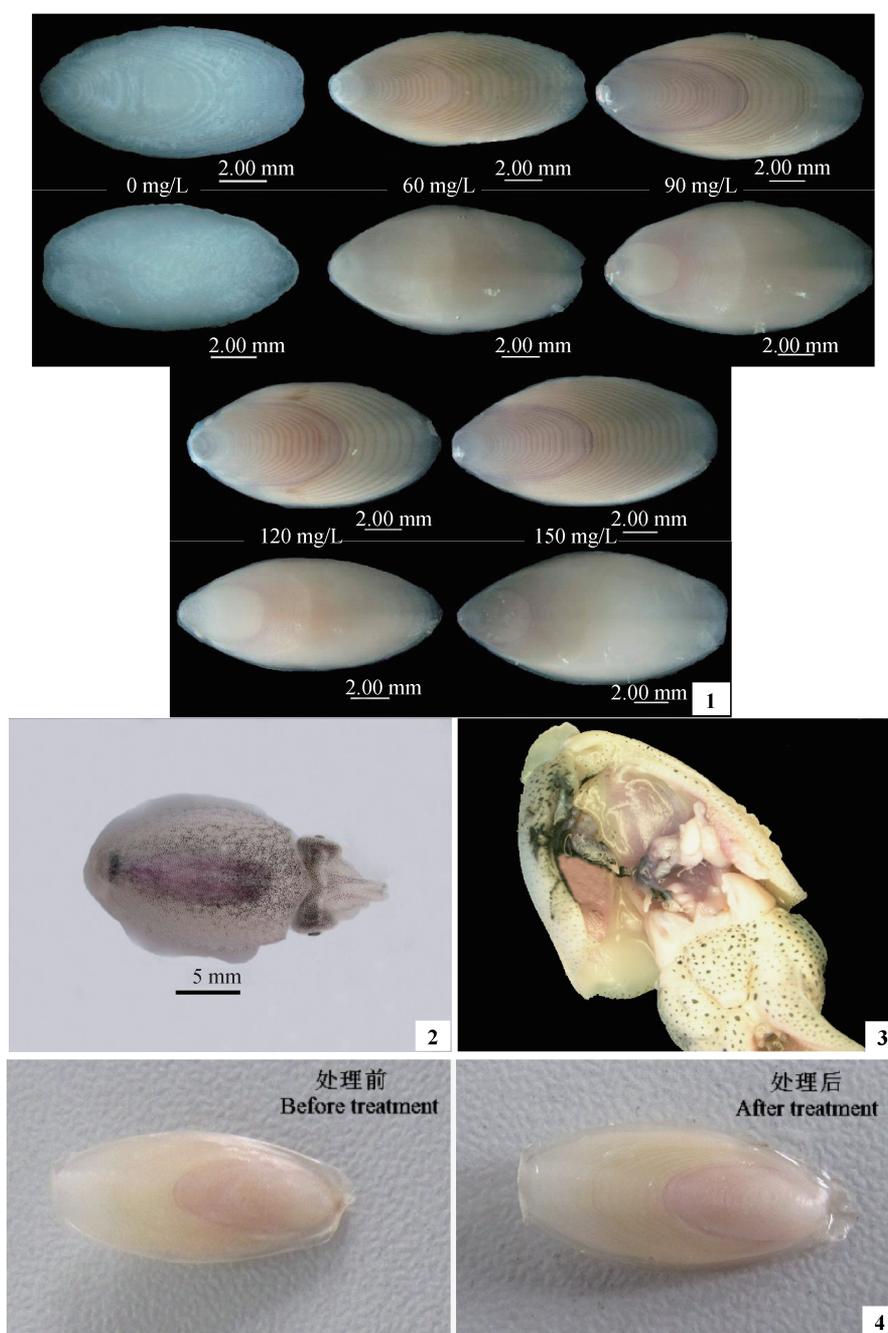
LIANG Jun, WANG Weiding*, XU Hanxiang, ZHOU Yongdong, XU Kaida

(Key Research Station for Fisheries Resources of Main Fishing Ground, Ministry of Agriculture;
Key Laboratory of Marine Culture of Zhejiang Province; Key Research Station of Sustainable Utilization for
Marine Fisheries Resources, Marine Fisheries Research Institute of Zhejiang Province, Zhoushan 316100, China)

Abstract: It is necessary to establish a highly efficient method of marking, which will provide technical guarantee for a more accurate assessment of stock-enhancement effect of the cuttlefish (*Sepiella japonica*). The cuttlefish were chosen as the experimental material in this study. The larval cuttlefish were immersed in alizarin complexone (ALC) to dye the cuttlebone. The experiment was divided into 5 groups with concentration gradient and 2 time periods, and dorsal mantle length, body weight and survival rate of cuttlefish were measured and observed. The trial group and control group (50 ind/group) were reared in 2.5 m diameter circular concrete ponds, respectively. The cuttlefish were sampled randomly in order to examine the dye-retention of the tagged cuttlebone after being tagged 5, 12, 19, 26 d. Moreover, the tagged cuttlefish were examined at high temperature treatment for 5 min. The results showed that the optimised dye concentration and immersed time were 90 mg/L and 24 h, respectively. The dorsal mantle length of cuttlefish had a significant positive correlation with body weight ($P < 0.01$), and there was no significant difference in growth between trial group and control group ($P > 0.05$). The tagged oval pink ring was still clear in the cuttlebone even after being tagged 26 d. The range and color of tagging parts were not changed before and after high temperature treatment. Additionally, the proposed method has effect on both internal signs and external signs, and the survival rate and dye-retention rate of the tagged cuttlefish are 100%. It is concluded that this method can be successfully applied to marking cuttlefish, and offer a number of benefits, including simple, efficient, high sample throughput, and a wide range of application prospects.

Key words: *Sepiella japonica*; fluorescent staining; marking; retention; survival rate

Corresponding author: WANG Weiding. E-mail: wdwang@sohu.com



图版

1. 不同浓度染液下曼氏无针乌贼内壳的正反面观；2. 标志后 26 d 曼氏无针乌贼背部肉眼可见标记；3. 标志 8 h 后乌贼内部组织；4. 高温处理前后曼氏无针乌贼内壳颜色变化。

Plate

1. Front and back view of the cuttlebone in different concentrations; 2. The view of cuttlebone mark after being tagged 26 d; 3. Internal organization of cuttlefish after being tagged 8 h; 4. Color change of cuttlebone before and after heat treatment.