

茜素络合物对鲤仔鱼耳石标记特征研究

邱晨^{1,2}, 姜涛², 陈修报², 刘洪波², 杨健^{1,2*}

(1. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081;

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 长江中下游渔业生态环境评价与
资源养护重点实验室, 江苏 无锡 214081)

摘要: 利用100 mg/L的茜素络合物(alizarin complexone, ALC)对鲤仔鱼进行48 h的水环境浸泡标记, 以探讨该ALC标记方法的特征, 及其对矢耳石、星耳石和微耳石的标记效果以及鱼体ALC浸泡、续养恢复与耳石ALC标记区域形成和消失的时滞进行研究。结果显示, 3种耳石在可见光和荧光下均能检测到明显的标记环。其中星耳石的标记效果最佳, 微耳石次之。耳石上荧光信号出现和消失的时间与鱼体ALC浸泡开始和结束的时间均存在1 d的时滞。此外, 浸泡标记过的鲤仔鱼在进行了长达50 d的续养恢复后, 其耳石上的ALC标记环仍清晰可见。研究表明, ALC标记法所形成的标记环在耳石上可长期存在, 使用ALC对鲤仔鱼进行生态标记具有很强的可行性。

关键词: 鲤; 耳石; 茜素络合物; 荧光标记

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

为了恢复渔业资源、提高渔业产量, 我国已适时地开展了向天然水域投放鱼、虾、蟹、贝等的人工增殖放流工作^[1-3]。2010年和2016年农业部亦分别印发了《全国水生生物增殖放流总体规划(2011—2015年)》和《关于做好“十三五”水生生物增殖放流工作的指导意见》等政策文件^[4]。与此相适应, 有效评价增殖放流效果将具有重要意义。

研究表明, 对增殖放流鱼类进行标记是评估效果的重要手段之一^[5]。迄今, 相关的标记技术种类繁多, 主要包括体内标记和体外标记两类^[6]。耳石荧光标记属体外标记中的化学标记, 是将荧光染料通过浸泡使其沉积在鱼类耳石上, 进而产生明显可识别的荧光标记的方法。以锶(Sr)和钙(Ca)为代表的基于耳石元素微化学“指纹”标记亦属化学标记^[7-10]。相对于传统标记, 耳石荧光标记操作简单, 甚至可在短时间内对鱼的受精卵、仔稚鱼等进行大规模标记,

并较为稳定, 不易消失^[11], 准确率达100%。目前, 耳石荧光标记法的研究已受到日益关注, 涉及到的种类包括半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)苗种^[12]、白鲢(*Coregonus lavaretus*)^[13]、日本白姑鱼(*Argyrosomus japonicus*)^[14]、许氏平鲈(*Sebastes schlegelii*)^[15]、大麻哈鱼(*Oncorhynchus keta*)^[8, 16]、唐鱼(*Tanichthys albonubes*)^[17]、大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)仔鱼^[18]、月鳢(*Channa asiatica*)仔鱼^[19]、秦岭细鳞(*Brachymystax lenok tsinlingensis*)^[20]、稀有鮎鲫(*Gobiocypris rarus*)和彭泽鲫(*Carassius auratus var. pengze*)仔、稚鱼^[21]、胭脂鱼(*Myxocyprinus asiaticus*)^[22]、黑棘鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)的发眼卵、仔鱼或稚鱼^[23]等。然而, 对相关荧光物质的浸泡方法及其标记效果评价的研究尚很少, 特别是在增殖放流主要类群的大宗淡水鱼类上几近缺乏。

鲤(*Cyprinus carpio*)是我国淡水鱼类中品种多、分布广、养殖历史悠久、产量大的大宗淡

收稿日期: 2017-12-26 修回日期: 2018-04-26

资助项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2016PT01); 农业财政专项(CJDC-2017-22)

通信作者: 杨健, E-mail: jiany@ffrc.cn

水鱼类之一, 具有极高的食用、药用及观赏价值^[24-25]。目前, 由于过度捕捞、自然生态环境破坏等的影响, 鲤野生资源量骤减, 人工增殖放流已成为资源补充和恢复的重要途径。但至今尚未发现有耳石荧光物质标记方面的研究。作为相关探索的第一步, 本研究选择标记浓度为100 mg/L的茜素络合物(alizarin complexone, ALC)作为荧光染料, 对大批量标记的鲤仔鱼个体开展实验; 以期确认利用ALC浸泡标记仔鱼的方法来进行耳石标记的可行性; 同时基于相应的标记特征, 来进一步确定观察和检测标记效果的适宜条件。上述工作拟从新角度, 为今后在鲤及其他经济鱼类和名贵鱼类增殖放流中有效使用相关标记技术提供理论和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 实验材料和养殖条件

本研究在江苏省无锡市中国水产科学研究院淡水渔业研究中心南区实验基地开展。实验鱼于2017年4月26日采自上述基地人工繁育的健康福瑞鲤个体(14日龄), 依据曹文宣等^[26]的划分标准归为仔鱼。研究使用初始体长为8~10 mm的实验鱼700尾, 随机取200尾作为实验组, 剩余500尾作为对照组。实验前鱼在装有经曝气水的玻璃缸中暂养1 d [100 cm×45 cm×50 cm (长×宽×高)]。暂养期间和之后ALC浸泡标记期间均不喂食, 续养恢复期间投喂蛋黄水和粉状普通配合饲料。每日清理鱼排泄物及换水1次, 换水量占养殖水体的25%。实验期间水温在18~24 °C之间, 自然光照, 不控光周期。

1.2 茜素络合物浸泡标记方法

茜素络合物为分析纯制剂, 购自国药集团化学试剂有限公司。分别选择0 mg/L和100 mg/L ALC作为对照组和标记组, 对实验鱼进行48 h浸泡实验(表1)。浸泡期间统计12、24、36及48 h期间内标记组和对照组的个体急性死亡情况, 及时移出死鱼, 浸泡处理过程中向实验水体中充气增氧。

浸泡标记48 h后, 将标记组200尾和对照组500尾实验鱼分别置于盛有100 L经曝气自来水玻璃缸(规格同上)中续养恢复。实验鱼采样分为两

表 1 茜素络合物浸泡48 h鲤仔鱼的死亡情况

Tab. 1 Death of larval *C. carpio* immersed in ALC for 48 h

组别 group	浓度/(mg/L) concentration	浸泡时间/h immersion time	样本数/n number of sample	死亡数/n number of death	死亡率/% mortality
对照组 control group	0	12	500	0	0
		24		0	0
		32		0	0
		48		2	0.4
标记组 marking group	100	12	200	1	0.5
		24		0	0
		32		1	0.5
		48		3	1.5

个阶段: (1)在续养恢复第5~35天的中期过程中, 标记组和对照组每隔5 d定期取样, 随机选取5尾进行耳石荧光标记观察。(2)在续养恢复第35天至实验结束的长期过程中, 中途不采样, 直至标记组和对照组实验鱼至少同时剩5尾时。之后无论是标记组或对照组一旦发现死鱼现象(本研究实际为续养恢复第50天), 立即进行最后一次取样, 以获取最长时间恢复后鲤耳石上荧光标记的保存情况。取样的同时测量其体质量-和全长(数据分别精确到0.01 g和0.01 cm), 保存于100%无水乙醇中, 用于观察耳石的荧光标记情况。

1.3 耳石的摘取与检测方法

将样本鱼置于解剖镜下, 用镊子和解剖针快速取出耳石, 区分矢耳石(sagitta)、星耳石(asteriscus)和微耳石(lapillus)。将耳石先用去离子水清除耳石表面的薄膜及杂质, 再用无水乙醇脱水、干燥, 使用电子探针微区分析仪(JXA-8100, 日本电子株式会社)对三类耳石形态进行扫描拍照(图1)。耳石荧光标记观察前使用透明无色指甲油将耳石(无需打磨)固定在玻璃片上, 等指甲油凝固后, 在OLYMPUS BX51型荧光显微镜下, 分别用可见光及荧光显微镜的2组滤光片(蓝色激发光WBS和绿色激发光WGS)对耳石进行比较观察。耳石标记效果(即ALC的荧光反应强度)参照欧阳斌等^[21]的方法按无、微弱、较明显、明显及非常明显5个等级来记录, 并利用显微镜自带的Streameye软件进行图谱拍照和图像处理。

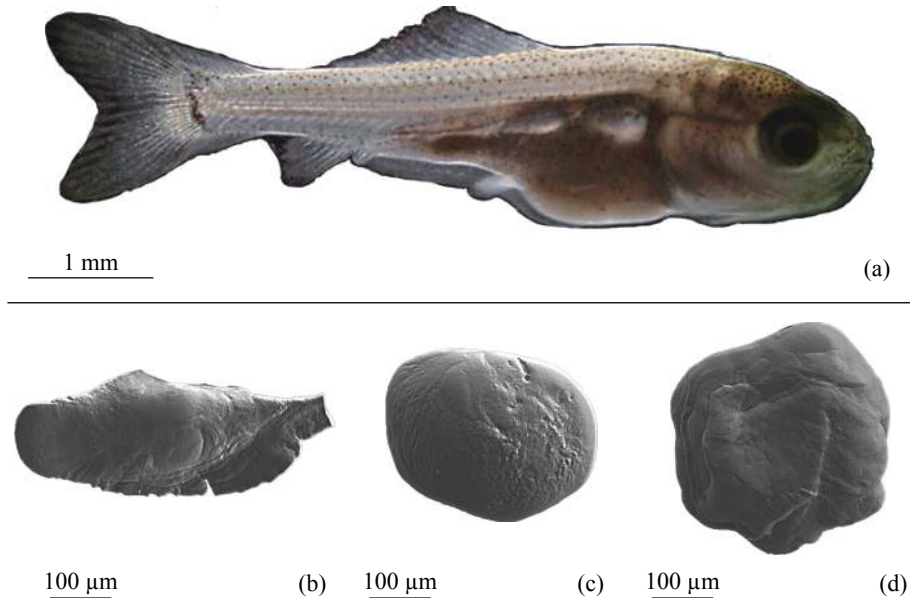


图1 本研究中实验鱼及鲤仔鱼三类耳石

(a)实验鱼; (b)矢耳石; (c)星耳石; (d)微耳石

Fig. 1 The larval *C. carpio* and its three types of otoliths in the present study

(a) experimental fish; (b) sagitta; (c) asteriscus; (d) lapillus

1.4 数据处理

本研究中按照死亡率(%)=死亡数(n)/样本数(N), 日瞬时生长速率表达为平均值±标准差(mean±SD), 仔鱼日瞬时生长速率 $G^{[18]}$ 按照如下公式进行计算:

$$G = 100 \times (\log_e L_f - \log_e L_i) / t_f - t_i$$

式中, L_f 为每个处理组的最终平均全长(cm), L_i 为初始平均全长(cm), $t_f - t_i$ 为饲养时间(d), 以 G 值来评估耳石标记对其生长的影响。采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)进行标记组与对照组实验鱼生长的差异显著性分析, 统计分析利用SPSS16.0统计学软件进行。设定差异显著性水平 P 为0.05, 当 $P < 0.05$ 时为差异显著。

2 结果

2.1 茜素络合物处理对鲤仔鱼生存及生长的影响

茜素络合物处理对鲤仔鱼生存及生长的影响 ALC浸泡标记过程中对照组和标记组实验鱼出现了1~3尾不等的死亡现象(表1), 经单因素方差分析表明, 对照组与标记组实验鱼的死亡率无显著差异($P > 0.05$), 说明ALC处理对鲤仔鱼

的应激性死亡影响很小, 且标记组中仔鱼的活动行为与对照组无明显区别, 游动和摄食正常。48 h浸泡处理后, 在长达50 d的续养恢复过程中, 实验鱼活动行为及摄食等与对照组无显著差异, 且对照组500尾鱼的总死亡率为49%和标记组200尾鱼的总死亡率为40.5%, 两者相近。

茜素络合物标记对鲤仔鱼生长的影响

以 G 值为指标来评价荧光标记对生长的影响, 恢复续养5~35 d后经单因素方差分析, 结果显示, 标记组与对照组的全长、体质量均无显著差异($P > 0.05$), 可见ALC处理后对鲤仔鱼的生长无显著影响(图2)。

2.2 茜素络合物标记效果的比较

不同光源下耳石茜素络合物浸泡标记信号的检测效果 标记组和对照组的耳石样品通过荧光显微镜的3组滤光片(蓝色激发光、绿色激发光和可见光)观察其荧光标记效果。结果显示, 3类耳石在3组光源下均可发现荧光标记(表2, 图3)。可见光下标记形成一条清晰、肉眼可见的紫色或紫红色的环。在两组荧光激发光源下, 虽然检测到的荧光标记环均为橘红色, 但荧光反应强度和颜色深度不同。在蓝色激发

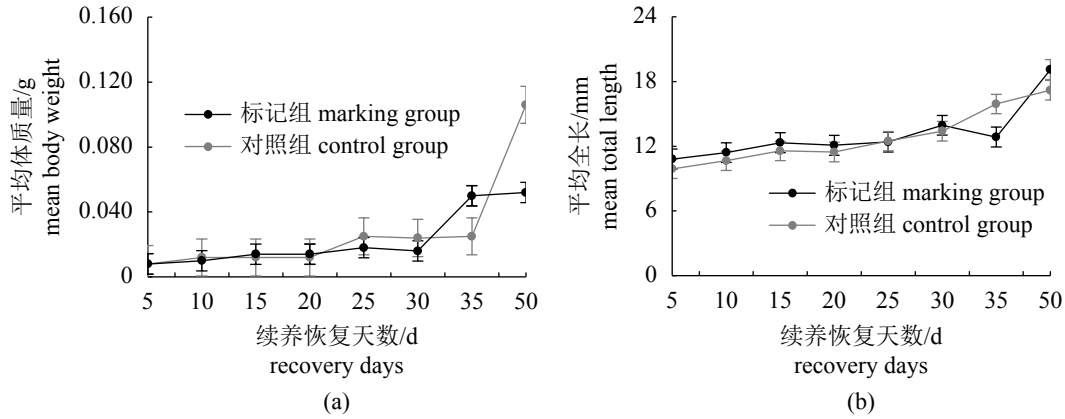


图 2 100 mg/L 茜素络合物浸泡标记对鲤仔鱼平均体质量和平均全长的影响(n=5)

(a)平均体质量; (b)平均全长

Fig. 2 Effects of 100 mg/L ALC marking on the mean body weight and mean total length of larval *C. carpio* (n=5)

(a) mean body weight; (b) mean total length

表 2 鲤仔鱼浸泡100 mg/L茜素络合物48 h的耳石ALC标记检测效果

Tab. 2 Effects of 100 mg/L ALC marking on otoliths of larval *C. carpio* for 48 h

取样数/n fish number	标记日龄/d marking age	浸泡天数/d immersing days	续养恢复天数/d recovery days	取样日龄/d sample age	标记强度 marking intensity		
					可见光 visible light	蓝色激发光 blue fluorescent light	绿色激发光 green fluorescent light
5	14	2	5	21	+	+	+
5	14	2	10	26	+	+	++
5	14	2	15	31	+	++	+
5	14	2	20	36	++	+++	++
5	14	2	25	41	++	+++	++
5	14	2	30	46	++	+++	+++
5	14	2	35	51	+++	++++	++++
5	14	2	50	66	+++	++++	++++

注: -. 无标记轮; +. 微弱; ++. 较明显; +++. 明显; +++. 非常明显

Notes: -. no marking ring; +. light marking ring; ++. relatively obvious marking ring; +++. obvious marking ring; +++. very obvious marking ring

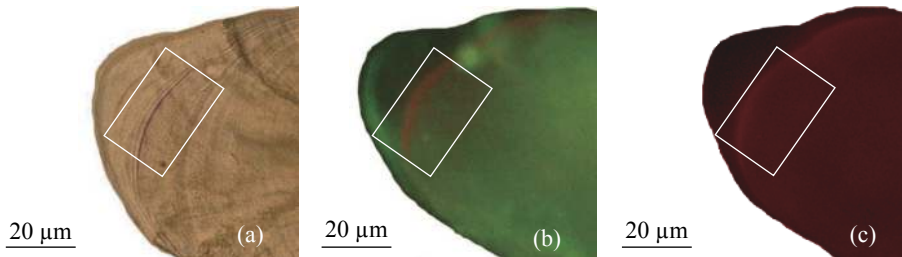


图 3 不同光源下鲤仔鱼矢耳石的茜素络合物浸泡标记效果

续养恢复10 d鱼的矢耳石分别在可见光(a)、蓝色(b)和绿色(c)激发光下的标记效果图; 方框指示标记轮边缘

Fig. 3 Effect of ALC marking in sagitta of larval *C. carpio* observed with different fluorescent lights

The marking effect in sagitta from the fish reared in 10 days after end of immersion under the visible light (a), blue (b) and green (c) fluorescent light, respectively; the boxes indicate the rims of the marking ring

光源下, 标记区在耳石中心区呈橘红色, 其外围为标记后续养恢复期间耳石新生长部分呈绿色; 在绿色激发光源下, 标记区在耳石中心区呈深橘红色, 其外围为标记后续养恢复期间耳石新生长部分呈淡橘红色。通过对不同激发光下荧光效果的比较发现, 蓝色激发光下的荧光反应最强; 因此, 在检测鲤仔鱼耳石上的ALC标记

环时使用蓝色激发光源应该更适宜且有效(图3)。

三类耳石的茜素络合物浸泡标记效果比较
相同日龄及相同续养恢复时间, 不同耳石上的标记强度不同。49日龄的续养恢复35 d的鲤仔鱼(表2), 矢耳石、星耳石和微耳石均可检测到荧光标记环, 其中星耳石效果最好, 标记环清晰, 颜色鲜艳; 微耳石次之(图4)。

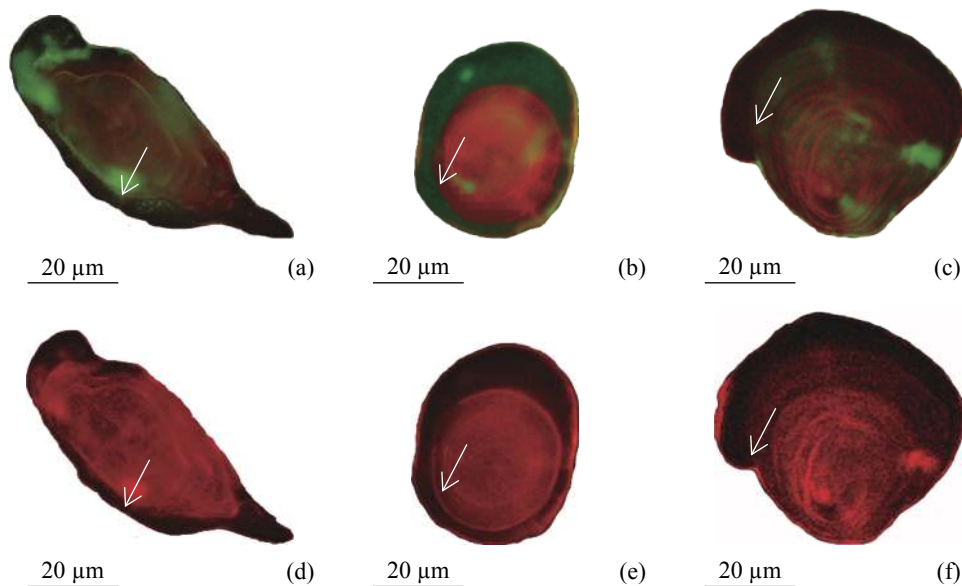


图4 鲤仔鱼三类耳石标记效果以及同种耳石不同激发光下的标记效果的比较

(a)和(d). 矢耳石, (b)和(e). 星耳石, (c)和(f). 微耳石; 均为续养恢复35 d时在蓝色、绿色激发光下的标记效果; 箭头指示标记轮边缘

Fig. 4 A comparison of ALC marking effect on the three different types of otolith from larval *C. carpio* under the same fluorescent light and the same type of otolith under the different fluorescent lights

(a)(d). sagitta, (b)(e). asteriscus, (c)(f). lapillus; the mentioned three pairs of otoliths were from the fish reared for 35 days after end of immersion under the blue, green fluorescent light; the arrow indicates the edge of the fluorescent marking ring

不同续养恢复时间下的星耳石茜素络合物标记的检测效果
经48 h浸泡标记后, 续养恢复第5、10天检测时, 星耳石上的标记效果微弱; 第15天时, 星耳石上的标记效果相对较明显; 第20天检测时, 星耳石上的荧光标记明显, 但第25、30天检测时, 星耳石上的荧光标记相对第20天检测时显得微弱; 第35、50天检测时, 星耳石上的荧光标记效果非常明显。说明48 h浸泡时间处理后, 星耳石上的荧光标记强度表现为无规律性, 而且随个体不同有很大的差异性。这与徐莉佳^[27]在斑马鱼(*Danio rerio*)上类似研究的结果相似。续养恢复5~50 d的显微观察显示, 鲤仔鱼的续养恢复时间不宜太短, 否则会看不到新长出的耳石区域, 无法与ALC标记部分作对比, 不易观察(图5)。因此, 在一定续养恢复时间内,

随着续养恢复时间的延长, 星耳石上荧光标记更易被观察到, 续养恢复时间以20 d以上为宜。

值得注意的是, 本研究显示100 mg/L ALC对鲤仔鱼耳石的浸泡标记效果较好, 在显微镜下观察容易辨识, 又能长时间保留染色效果。对实验鱼自实验开始连续50 d进行耳石取样发现, 各取样天数实验鱼耳石的荧光信号强度差异不大, 即使在第50天其信号强度与第5天时并无明显差异(图5), 并未有减弱的趋势, 表明ALC对耳石的标记效果较为持久。

2.3 鲤仔鱼经茜素络合物浸泡后耳石标记出现和消失的时滞

本实验开始浸泡标记的鲤仔鱼日龄为14 d, 15~16 d为浸泡标记时间, 续养恢复5 d, 日龄为

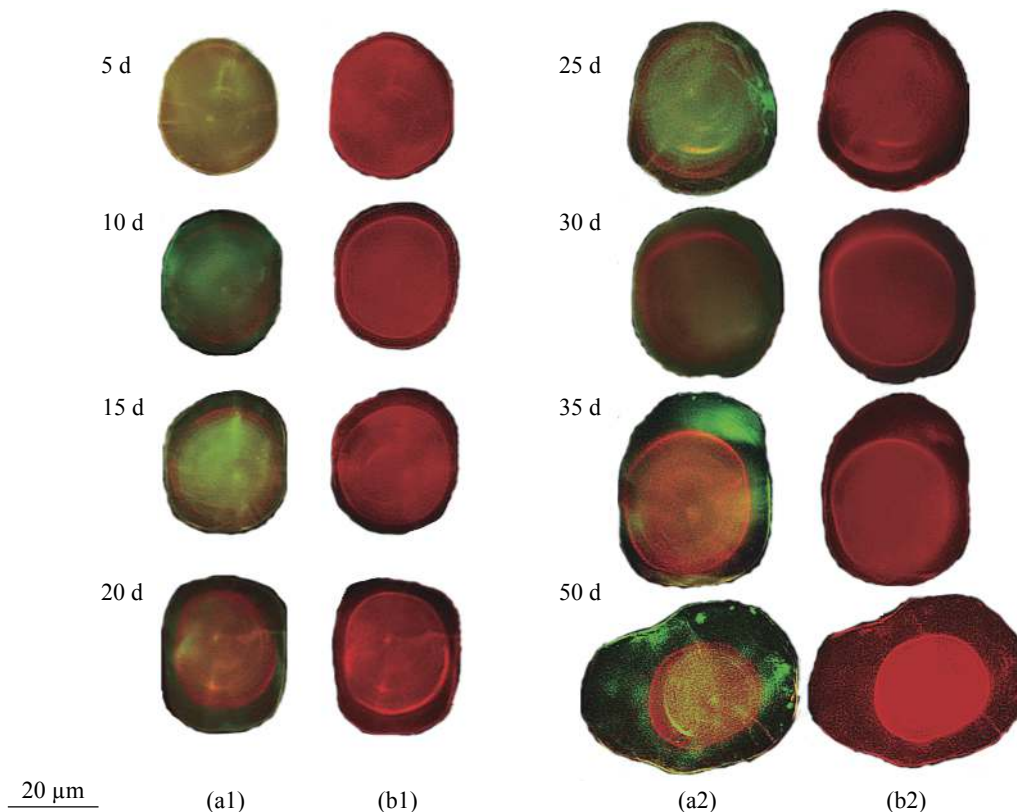


图 5 不同续养恢复时间下鲤仔鱼星耳石分别在蓝色激发光和绿色激发光下的标记效果比较 (a1)、(a2)两列表示在蓝色激发光下的标记效果; (b1)、(b2)两列表示在绿色激发光下的标记效果

Fig. 5 Comparison of ALC marking effect in asteriscus of larval *C. carpio* under blue fluorescent light and green fluorescent light for various days of recovery rearing after immersion

Two columns of (a1) and (a2) show marking effect under blue fluorescent light, while two column of (b1) and (b2) show marking effect under green fluorescent light, respectively

21 d (表2)。而通过读取耳石上暗纹发现荧光标记轮为两轮, 第16、17日轮具有荧光反应, 第18日轮之后无荧光反应。说明从鲤仔鱼开始浸泡到耳石上反映出荧光标记信号需要1 d的时滞, 而荧光信号在耳石上消失时间也是1 d的时滞。在对续养恢复10 d的鲤仔鱼耳石标记日龄推算时亦可同理证明这一点(图6)。

3 讨论

3.1 100 mg/L茜素络合物浸泡鲤仔鱼形成耳石标记的可行性

正因荧光物质会在鱼类耳石等其他硬骨组织上形成长久性标记, 到目前为止, 此类物质的研究广受关注, 且发现不同荧光物质的浸泡标记效果、标记效率及对目标鱼类的影响等方面差异会很大。一般来看, ALC、茜素红S (alizarin-red S)、盐酸四环素(tetracyclin hydrochlorid,

TCHC)、钙黄绿素(calcein, CAL)和土霉素(Oxytetracycline, OTC)等较常用于仔、稚鱼的标记^[28-30], 但荧光物质的选择宜因对象鱼种、规格和标记条件而异^[21]。在本研究中TCHC和CAL不宜作为荧光标记物质。已有研究表明, TCHC溶液对鱼体有较大的毒性^[21-22, 31], 易造成鱼苗不同程度的不适应甚至急性死亡, 说明鱼苗对TCHC的敏感程度较大。而CAL便于检测且荧光标记持久, 同时能检测到荧光反应强度不一的绿色荧光标记^[32]。但CAL对很多鱼类耳石的标记效果较差, 这是由于耳石自身带有一定强度的绿色荧光, 这与CAL标记产生的荧光颜色非常接近^[27]。因而在不同浸泡时间处理和不同浸泡液浓度处理下, 很难断定CAL的准确标记率。ALC是一种化工产品, 常用作络合滴定指示剂和酸碱指示剂, 亦可用于荧光染料。相对其他浸泡标记物而言, ALC是较早用来对鱼类进行荧光标记的荧光物质之一, 多数研究表明ALC标记物明显且相

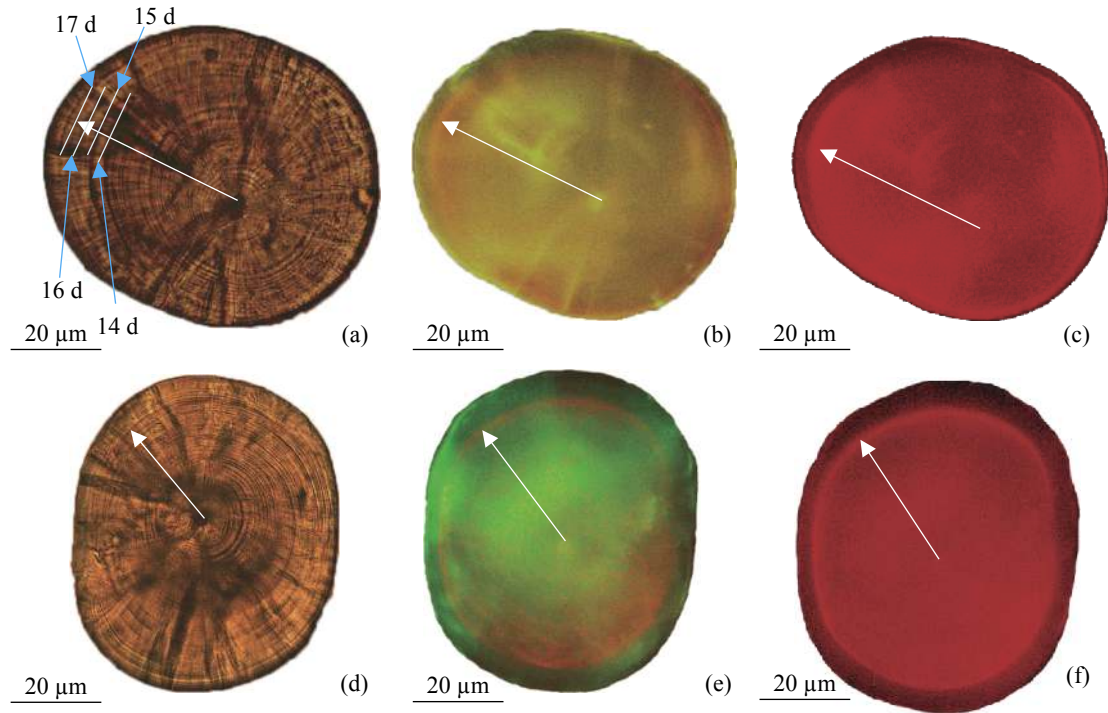


图6 鲤仔鱼星耳石中ALC标记出现和消失时间的推算

(a)、(b)、(c)为续养恢复5 d的星耳石分别在可见光、蓝色和绿色激发光下标记效果图，(d)、(e)、(f)为续养恢复时间为10 d的星耳石分别在可见光、蓝色和绿色激发光下标记效果图；箭头指示由耳石核心指向荧光标记轮边缘；14 d、15 d、16 d、17 d表示第14、15、16、17日龄

Fig. 6 Back-calculation of possible time lag for occurrence and disappearance of ALC marking in asteriscus of larval *C. carpio*

(a), (b), (c) show the marking effects in asteriscus of the fish reared in 5 days after end of immersion under the visible light, blue and green fluorescent light, respectively, (d), (e), (f) show the marking effects in asteriscus of the fish reared for 10 days after end of immersion under the visible light, blue and green fluorescent light, respectively; the arrow indicates that the core of the otolith point to the edge of the fluorescent marking ring; the 14 d, 15 d, 16 d, 17 d show the 14th, 15th, 16th, 17th daily age

对安全^[13-23]。因此，本研究采用的ALC，是标记鲤仔鱼较理想的荧光物质。

为获得理想标记效果而又保持最高存活率，必须选择适宜的ALC浸泡浓度。作为相关研究的第一步，本研究只选择了一个适中的标记浓度(100 mg/L)开展研究。鲤仔鱼在浸泡标记期间及续养恢复期间的养殖过程中对照组和标记组均有一定的死亡率，虽然养殖密度效应及ALC潜在的毒性效应是最容易引起怀疑的因素，但仅凭本次研究的结果尚无法确认或证实，急需开展进一步有针对性的工作来证实。有研究表明100 L水中的鲤放养密度界限可达9~10 kg^[33]。本研究对照组和标记组的养殖密度均在此范围之内，且两组死亡率相似，表明养殖密度及100 mg/L ALC浸泡浓度对鲤仔鱼成活率无显著影响。标记组和对照组在续养恢复35 d之前，生长情况并无显著差异，35~50 d的养殖过程中存在

较大差异，一方面，使用荧光染料浸泡标记鱼体，在续养恢复后期鱼体生长可能会产生显著差异^[34-35]，另一方面，对照组养殖密度较标记组高但喂食比例一致，可能会导致对照组和标记组生长出现差异，这些均有待证实。前人的研究结果显示，可成功进行ALC标记的安全浸泡浓度一般在50~400 mg/L^[18, 36-37]。徐永江等^[12]综合考虑存活率和标记效果，结果得出ALC浸泡标记半滑舌鳎苗种耳石的适宜浓度为100 mg/L；徐采等^[19]使用的ALC浓度为100 mg/L时，月鲤仔鱼浸泡24 h后存活率为100%。Shirai等^[38]使用100 mg/L ALC标记日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)得到了较好的标记效果。付自东等^[22]发现ALC浸泡液的浓度为50~200 mg/L时，胭脂鱼仔鱼成活率为100%，在浸泡后的饲养阶段未发现死亡个体。因此，综合考虑成活率以及标记效果，对于鲤仔鱼ALC有效标记而言，本研究初步选用的100 mg/L是较为

实用浓度。所有被标记个体均未发现有异常行为, 同时续养恢复过程中标记组的死亡率及生长情况与对照组均相近。后续会在本研究的基础上, 对鲤仔、稚和幼鱼耳石标记最佳浸泡浓度梯度和浸泡时间作进一步优化, 以确定ALC标记鲤耳石最佳条件, 并尝试建立适用于鲤及其他鲤科鱼类人工增殖放流鱼苗的ALC标记的规范和标准。此外, 从水产品安全角度来看, 我们还需关注ALC荧光染料在鱼体肌肉和其他组织中的残留量及是否会对人体有害等问题。然而, 目前尚未发现有荧光染料在鱼体内残留的研究文献, 这可能与生物体内荧光染料残料量的检测方法尚未建立有关, 急需得到突破。

3.2 茜素络合物标记浸泡效果检测条件的优化

通常用荧光物质浸泡标记鱼类耳石需在荧光显微镜下观察荧光标记, 且对不同种类的鱼, 荧光标记检测时显微镜的最适激发光源可能不同, 大多数的研究者多选用紫外激发光源进行检测和观察。但Vigliola^[39]、何春林等^[40]用荧光物质标记某些鱼类时发现, 耳石上的荧光标记在可见光下同样可以被识别, 而且, 不仅可以检测到标记环, 标记环前后的生长日轮也能够清晰可见, 可更方便地获取标记鱼的日龄及不同标记间隔时间或标记后的生长天数等信息。本研究中被标记的矢耳石、星耳石及微耳石在可见光下亦均可观察和检测到一条紫红色标记轮。不仅如此, 在前人研究的基础上, 本研究还选择了在蓝色和绿色激发光源下对耳石进行观察。虽然在鲤仔鱼耳石上都检测到预期的橘红色ALC标记环, 但不同激发光下耳石的荧光效果强度不尽相同, 且蓝色激发光下荧光标记的信号最强。因此, 研究人员在观察鲤仔鱼耳石ALC标记效果时, 蓝色激发光应该为首选检测光源。

3.3 耳石ALC标记区域的观察和判定

本研究利用透明无色指甲油对耳石进行包埋和封片, 对耳石不仅具有透明的作用, 相对于使用二甲苯更安全, 透明效果更好。而且通过本研究结果显示, 在观察鲤仔鱼荧光标记效果时, 未经打磨的耳石包埋后在荧光显微镜下荧光标记和日轮特征非常明显。

荧光检测ALC标记非常明显, 标记率为100%。由于本研究耳石样品未经打磨, 且耳石

本身呈自核心向外的包裹状生长, 因此用荧光显微镜观察到的原本应是一整个标记球面。然而本实验中续养5、10、15、25 d耳石近边缘部位可看到一轮标记环, 而续养恢复20、30、35、50 d耳石近中心可看到一个标记球。靳建波等^[20]利用茜素络合物浸泡标记秦岭细鳞发眼卵及仔鱼耳石时发现了相同的现象, 认为标记轮产生的原因可能是由于耳石被标记部位边缘的自发荧光现象所致。本研究结果既可看到标记“轮”, 又可看到标记“球”, 但二者可能是由于耳石包埋时所放位置有差异, 在激发光观察时所获相差不同所致; 因其均为成功标记后才能产生, 故不影响对标记区域的观察和标记效果的判断。

3.4 影响茜素络合物标记效果的因素

荧光标记效果与荧光物质浓度、浸泡时间和标记鱼个体生长阶段有关。当ALC浸泡液在一定的浓度范围内时, 如果浸泡标记持续时间相同, 仔、稚鱼耳石上荧光标记环的强度则随着浸泡浓度梯度的上升而增加; 而如果标记的浓度相同时, 耳石上标记环的强度则随着标记持续时间的延长而增加^[39]。从标记鱼生长阶段来看, 当浸泡液浓度相同时, 同龄的不同个体间, 其荧光标记环强度差别不大, 但对不同龄个体的标记效果则相差很大。低龄个体标记环荧光效果则可能会较强^[23]。有研究表明, 在受精卵胚胎发育期与早期鱼体生长最快的时期, 是鱼类染色标记的最佳阶段^[41-42], 这也许与鱼类自身的代谢有关, 低龄鱼比高龄鱼有更高的代谢率, 因此吸收荧光物质更多一些^[42]。鉴于上述原因, 在对鲤鱼耳石进行荧光浸泡标记时应充分考虑鱼生长阶段、标记物质浓度以及标记浸泡时间等因素。本研究所选的100 mg/L ALC浓度对鲤仔鱼进行标记, 通过48 h的浸泡足以保证获得理想的标记效果。

3.5 鲤仔鱼耳石茜素络合物标记出现及消失的时滞特征

目前, 虽然业界已经认可荧光标记对大多数鱼类有较好的效果^[13-23], 但对耳石荧光标记的出现及消失是否存在时滞尚缺乏研究。本研究首次尝试通过对鲤仔鱼耳石进行微结构的观察来了解相关特征。笔者发现, 耳石上荧光信号的出现和消失时间与鱼体ALC浸泡开始和结束的时间不相吻合, 的确存在一定的时间差(时滞)。

本研究还发现, 由于鲤仔鱼的矢耳石形态不规则(呈漏斗状), 微耳石个体较小, 同时两类耳石都较脆易碎, 因此均不是时滞研究的最好材料。而星耳石却优势明显, 即使不经打磨, 其日轮纹仍清晰可数, 故采用星耳石上的轮纹进行日轮计数更为适宜^[43]。董双林等^[44]研究发现, 鲤仔鱼星耳石上的第1日轮是在破膜后24 h之内形成的, 因此星耳石上的日轮数与实际日龄相同。本研究用浓度为100 mg/L ALC对14 d日龄的鲤仔鱼进行48 h(即2 d)的浸泡处理, 则15、16 d即为浸泡标记时间的日龄。通过耳石上微化学结构观察发现, 第16、17日轮区域具有荧光反应, 第18日轮之后的区域则无荧光反应。这种现象显示出鲤仔鱼从开始ALC浸泡到耳石上反映出荧光标记信号, 以及ALC浸泡结束后到耳石上荧光信号消失均需要1 d的时滞。根据此结论, 如果要有效观察和检测鱼类ALC浸泡耳石标记效果时, 就不能在鱼体浸泡当天取样, 而是在浸泡结束后的第2天开始取样为宜。

4 结论

本研究首次选用具有大批量标记潜力的鲤仔鱼, 采用ALC标记物通过浸泡标记对在耳石上的标记效果进行了较为系统的研究。在单一100 mg/L ALC浓度下, 对鲤仔鱼进行48 h的浸泡足以在耳石上获得理想的标记效果。星耳石、微耳石和矢耳石均可在可见光、蓝色和绿色激发荧光光源下检测到明显的标记环; 但星耳石的效果最佳, 而微耳石次之。耳石上荧光标记出现和消失的时间与鱼体ALC浸泡开始和结束时间均存在1 d的时滞。实验鱼在经浸泡处理后续养恢复50 d, 耳石上ALC的标记区仍清晰可见, 表明耳石ALC标记至少能稳定存在50 d。本研究对今后在鲤及其他经济、名贵鱼类上开展增殖放流效果的评价将具有很好的借鉴作用。

参考文献:

- [1] 邓景耀, 叶昌臣. 渔业资源学[M]. 重庆: 重庆出版社, 2001: 306-307.
Deng J Y, Ye C C. Science of fishery resources[M]. Chongqing: Chongqing Press, 2001: 306-307(in Chinese).
- [2] Doherty, Peter. Recruitment limitation is the theoretical basis for stock enhancement in marine populations[M]// Howell BR, Moksness E, Svåsand T. Stock Enhancement and Sea Ranching. Oxford: Blackwell Publishing, 1999: 9-21.
- [3] 潘绪伟, 杨林林, 纪炜炜, 等. 增殖放流技术研究进展[J]. 江苏农业科学, 2010(4): 236-240.
Pan X W, Yang L L, Ji W W, et al. Research progress on technology of enhancement and releasing[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2010(4): 236-240(in Chinese).
- [4] 罗刚, 庄平, 赵峰, 等. 我国水生生物增殖放流物种选择发展现状、存在问题及对策[J]. 海洋渔业, 2016, 38(5): 551-560.
Luo G, Zhuang P, Zhao F, et al. Development status, existing issues and countermeasure in the selection of suitable species for stock enhancement[J]. *Marine Fisheries*, 2016, 38(5): 551-560(in Chinese).
- [5] 张雪, 郭艳娜, 张虎成. 水电站鱼类人工增殖放流标记方法研究概述[J]. 环境科学与管理, 2013, 38(12): 127-130.
Zhang X, Guo Y N, Zhang H C. Overview of fish marking method about artificial propagation and releasing in hydropower station[J]. *Environmental Science and Management*, 2013, 38(12): 127-130(in Chinese).
- [6] 熊国勇. 渔业研究中的标志放流[J]. 南昌师范学院学报, 2008, 29(6): 42-44.
Xiong G Y. Tagged Releasing in Fishery Research[J]. *Journal of Jiangxi Institute of Education (Comprehensive)*, 2008, 29(6): 42-44(in Chinese).
- [7] 李孟孟, 姜涛, 陈婷婷, 等. 长江安庆江段刀鲚耳石微化学及洄游生态学意义[J]. 生态学报, 2017, 37(8): 2788-2795.
Li M M, Jiang T, Chen T T, et al. Otolith microchemistry of the estuarine tapertail anchovy *Coilia nasus* from the Anqing section of the Yangtze River and its significance for migration ecology[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2017, 37(8): 2788-2795(in Chinese).
- [8] 王臣. 基于大麻哈鱼耳石的化学标记及其应用研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2015.
Wang C. Exploring of chemical marking modes based on chum salmon otoliths and related applications[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2015(in Chinese).
- [9] 姜涛, 周昕期, 刘洪波, 等. 鄱阳湖刀鲚耳石的两种微化学特征[J]. 水产学报, 2013, 37(2): 239-244.
Jiang T, Zhou X Q, Liu H B, et al. Two microchemistry patterns in otoliths of *Coilia nasus* from Poyang Lake,

- China[J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(2): 239-244(in Chinese).
- [10] 朱国平. 金枪鱼类耳石微化学研究进展[J]. 应用生态学报, 2011, 22(8): 2211-2218.
- Zhu G P. Otolith microchemistry of tuna species: research progress[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2011, 22(8): 2211-2218(in Chinese).
- [11] 耿倩, 张淑荣, 段妍, 等. 荧光标记技术在增殖放流中的应用现状[J]. 水产科学, 2016, 35(3): 308-312.
- Geng Q, Zhang S R, Duan Y, et al. Application status of fluorescence-labeled technique in stock enhancement[J]. Fisheries Science, 2016, 35(3): 308-312(in Chinese).
- [12] 徐永江, 柳学周, 史宝, 等. 茜素络合物对半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)苗种耳石的染色标记效果[J]. 渔业科学进展, 2016, 37(6): 11-18.
- Xu Y J, Liu X Z, Shi B, et al. Alizarin complexone marking of otoliths of juvenile *Cynoglossus semilaevis*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2016, 37(6): 11-18(in Chinese).
- [13] Eckmann R. Alizarin marking of whitefish, *Coregonus lavaretus* otoliths during egg incubation[J]. Fisheries Management and Ecology, 2010, 10(4): 233-239.
- [14] Taylor M D, Fielder D S, Suthers I M. Batch marking of otoliths and fin spines to assess the stock enhancement of *Argyrosomus japonicus*[J]. Journal of Fish Biology, 2005, 66(4): 1149-1162.
- [15] Lü H J, Zhang X M, Fu M, et al. Use of tetracycline hydrochloride and alizarin complexone for immersion marking black rockfish *Sebastes schlegelii*[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2014, 32(4): 810-820.
- [16] 王臣, 刘伟, 王继隆, 等. 大麻哈鱼胚胎耳石的茜素红标记及其效果评价[J]. 中国水产科学, 2014, 21(6): 1268-1276.
- Wang C, Liu W, Wang J L, et al. Otolith tagging and related discussions with alizarin red S in chum salmon (*Oncorhynchus keta*) at stage of embryos[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2014, 21(6): 1268-1276(in Chinese).
- [17] 王正鲲, 赵天, 林小涛, 等. 茜素络合物对唐鱼耳石标记效果以及生长和存活率的影响[J]. 生态学杂志, 2015, 34(1): 189-194.
- Wang Z K, Zhao T, Lin X T, et al. Effects of alizarin complexone (ALC) on otolith marking, growth, and survival of *Tanichthys albonubes*[J]. Chinese Journal of Ecology, 2015, 34(1): 189-194(in Chinese).
- [18] Lagardère F, Thibaudeau K, Bégout Anras M L. Feasibility of otolith markings in large juvenile turbot, *Scophthalmus maximus*, using immersion in alizarin-red S solutions[J]. ICES Journal of Marine Science, 2000, 57(4): 1175-1181.
- [19] 徐采, 陈国柱, 林小涛, 等. 月鳢仔鱼耳石的荧光标记及其日轮确证[J]. 水生态学杂志, 2012, 33(2): 110-114.
- Xu C, Chen G Z, Lin X T, et al. Otolith Tagging and daily increments validation with fluorescent substance in larval *Channa asiatica*[J]. Journal of Hydroecology, 2012, 33(2): 110-114(in Chinese).
- [20] 靳建波, 危起伟, 孙庆亮, 等. 茜素络合物浸泡标记秦岭细鳞鲑发眼卵及仔鱼耳石[J]. 淡水渔业, 2011, 41(2): 10-17.
- Jin J B, Wei Q W, Sun Q L, et al. Alizarin marking of otolith at eyed eggs and larvae stages in *Brachymystax lenok tsinlingensis*[J]. Freshwater Fisheries, 2011, 41(2): 10-17(in Chinese).
- [21] 欧阳斌, 常剑波. 荧光物质浸泡标记稀有鮡鲫和彭泽鲫仔、稚鱼[J]. 水生生物学报, 1999, 23(4): 324-329.
- Ouyang B, Chang J B. Using fluorescent substance to mark larvae and juvenile of *Gobiocypris rarus* and *Carassius auratus pengze* var[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1999, 23(4): 324-329(in Chinese).
- [22] 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.
- Fu Z D, Li J, Yue B S, et al. Otolith marking of larval and juvenile Chinese sucker with fluorescent substances[J]. Chinese Journal of Zoology, 2005, 40(4): 60-65(in Chinese).
- [23] 刘岩, 孙典荣, 耿倩, 等. 茜素红与钙黄绿素标记不同规格黑鲷幼鱼的比较研究[J]. 南方水产科学, 2016, 12(3): 17-24.
- Liu Y, Sun D R, Geng Q, et al. Comparative study on immersion marking with alizarin red S and calcein for black porgy *Acanthopagrus schlegelii* of different sizes[J]. South China Fisheries Science, 2016, 12(3): 17-24(in Chinese).
- [24] 程镇燕, 曲木, 孙颖, 等. 精氨酸在体内和体外试验中对鲤鱼免疫力的影响[J]. 动物营养学报, 2017, 29(9): 3293-3300.
- Cheng Z Y, Qu M, Sun Y, et al. Effects of arginine on

- immunity of carp (*Cyprinus carpio*) *in vivo* and *in vitro* experiment[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2017, 29(9): 3293-3300(in Chinese).
- [25] 王蕾, 李华, 高志辉, 等. 鲤鱼LGP2的基因克隆与表达[J]. 济南大学学报(自然科学版), 2017, 31(6): 506-512.
Wang L, Li H, Gao Z H, *et al.* Molecular characterization and expression analysis of LGP2 in common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. *Journal of University of Jinan (Science and Technology)*, 2017, 31(6): 506-512(in Chinese).
- [26] 曹文宣, 常剑波, 乔晔, 等. 长江鱼类早期资源[M]. 北京: 中国水利水电出版社, 2007: 169-171.
Cao W X, Chang J B, Qiao Y, *et al.* Fish resources of early life history stages in Yangtze River[M]. Beijing: China Water Power Press, 2007: 169-171(in Chinese).
- [27] 许莉佳. 荧光标记斑马鱼稚鱼耳石的效果及其对抗氧化酶活力的影响[D]. 重庆: 西南大学, 2012.
Xu L J. Marking juvenile Zebrafish with fluorescent substances and its effects on antioxidases[D]. Chongqing: Southwest University, 2012(in Chinese).
- [28] 片倉靖次, 太田守信, 神正人, 等. Oxytetracycline, alizarin complexoneおよび alizarin Red Sを用いたスケトウダラ幼魚の耳石染色実験[J]. *水産増殖*, 2003, 51(3): 327-335.
Katakura S, Ohta M, Jin M, *et al.* Otolith-marking experiments of juvenile walleye pollock *theragra chalcogramma* using oxytetracycline, alizarin complexone, and alizarin red S[J]. *Aquaculture Science*, 2003, 51(3): 327-335(in Japanese).
- [29] Tsukamoto K. Otolith tagging of ayu embryo with fluorescent substances[J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1988, 54(8): 1289-1295.
- [30] Snow R A, Long J M. Otolith marking of juvenile short-nose gar by immersion in oxytetracycline[J]. *North American Journal of Fisheries Management*, 2017, 37(4): 724-728.
- [31] 宋昭彬, 曹文宣. 鳊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.
Song Z B, Cao W X. Otolith marking and daily increment validating in larval and juvenile yellowcheek carp, *Elopichthys bambusa*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1999, 23(6): 677-682(in Chinese).
- [32] Lü H J, Chapelsky A, Zhang Z X, *et al.* Can calcein and alizarin complexone be used for double immersion marking of juvenile qingbo *Spinibarbus sinensis*?[J]. *Fisheries Science*, 2017, 83(5): 767-776.
- [33] 刘世英. 鲤鱼放养密度的界限[J]. *淡水渔业*, 1975(11): 33.
Liu S Y. The limits of stocking density of *Cyprinus carpio*[J]. *Freshwater Fisheries*, 1975(11): 33(in Chinese).
- [34] 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(4): 1108-1113.
- [35] Simon J, Dörner H, Richter C. Growth and mortality of European glass eel *Anguilla anguilla* marked with oxytetracycline and alizarin red[J]. *Journal of Fish Biology*, 2009, 74(1): 289-295.
- [36] Lang J B, Buxton C D. Validation of age estimates in sparid fish using flubrochrome marking[J]. *South African Journal of Marine Science*, 1993, 13(1): 195-203.
- [37] Beckman D W, Schulz R G. A simple method for marking fish otoliths with alizarin compounds[J]. *Transactions of the American Fisheries Society*, 1996, 125(1): 146-149.
- [38] Shirai K, Otake T, Amano Y, *et al.* Temperature and depth distribution of Japanese eel eggs estimated using otolith oxygen stable isotopes[J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2018, 236: 373-383.
- [39] Vigliola L. Validation of daily increment formation in otoliths for three *Diplodus* species in the Mediterranean Sea[J]. *Journal of Fish Biology*, 1997, 51(2): 349-360.
- [40] 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.
He C L, Fu Z D, Yan T M, *et al.* Otolith Marking of larval *Schizothorax davidi* with fluorescent substances[J]. *Sichuan Journal of Zoology*, 2008, 27(3): 331-334(in Chinese).
- [41] Eckmann R, Czerkies P, Helms C, *et al.* Evaluating the effectiveness of stocking vendace (*Coregonus albula* (L.)) eleutheroembryos by alizarin marking of otoliths[J]. *Advances in Limnology*, 1998, 50: 457-463.
- [42] 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.
- [43] 向德超, 何竹, 朱杰, 等. 鲫鱼耳石日轮研究[J]. 西南农业大学学报, 1997, 19(5): 451-454.
- Xiang D C, He Z, Zhu J, *et al.* The study on daily growth increments in otoliths of *Carassias auratus*[J]. Journal of Southwest Agricultural University, 1997, 19(5): 451-454(in Chinese).
- [44] 董双林, 王志余, 于信勇, 等. 鲤鱼仔、稚和幼鱼早期耳石上日轮的初步观察[J]. 大连水产学院学报, 1986, 4(1): 58-62.
- Dong S L, Wang Z Y, Yu X Y, *et al.* Observation on the daily increments in larval common carp otolith[J]. Journal of Dalian Fisheries College, 1986, 4(1): 58-62(in Chinese).

Study on otolith marking of larval common carp *Cyprinus carpio* by immersion in alizarin complexone

QIU Chen^{1,2}, JIANG Tao², CHEN Xiubao², LIU Hongbo², YANG Jian^{1,2*}

(1. College of Wuxi Fisheries, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China;

2. Key Laboratory of Fishery Ecological Environment Assessment and Resource Conservation in Middle and Lower Reaches of the Yangtze River, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China)

Abstract: The artificial release is one of successful approaches for natural fishery stock enhancement. Therefore, effective marking techniques are expected to be applied for assessment of the contribution of released fishes to the fishery resources. Because fish at larval stages are better for batch marking and releasing, in the present study, larval common carp *Cyprinus carpio* were immersed in the 100 mg/L of alizarin complexone (ALC) for 48 h, so as to compare and investigate the marking characteristics of this method among sagitta, asteriscus and lapillus, as well as the possible time lag between start/end of fish ALC immersion and corresponding start/end of the fluorescent signal on otolith. Results suggested that marking rings in aforementioned three types of otolith were significantly observed in both visible and fluorescent lights. As for the ALC marking effect, asteriscus (the best) and lapillus (the second) were relatively better than sagitta. One-day time lag was found, respectively, between start of fish immersion and corresponding start of otolith marking, as well as end of fish immersion and corresponding end of ALC marking in extended area on otolith. The otolith ALC marking rings could still be obviously noted, even the fish was reared for 50 days after end of immersion. This phenomenon showed that ALC marking ring could be preserved on otolith for quite a long period. Consequently, the present method of ALC immersion will have strong feasibility for otolith ecological marking of larval *C. carpio*.

Key words: *Cyprinus carpio*; otolith; alizarin complexone (ALC); fluorescence marking

Corresponding author: YANG Jian. E-mail: jiany@ffrc.cn

Funding projects: Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund (2016PT01); Agricultural Financial Special Support Fund (CJDC-2017-22)