

用荧光物质浸泡标记胭脂鱼仔、稚鱼耳石

付自东 李 静 岳碧松 宋昭彬*

(四川大学生命科学学院 生物资源与生态环境教育部重点实验室 成都 610064)

摘要:用茜素络合物和盐酸四环素溶液分别对胭脂鱼(*Myxocyprinus asiaticus*)仔、稚鱼浸泡标记,结果表明,100~200 mg/L的茜素络合物溶液浸泡24 h对胭脂鱼仔、稚鱼耳石有很好的标记效果。相同浸泡浓度下,随着日龄的增长,耳石上的荧光反应强度降低。三对耳石中,微耳石和矢耳石对茜素络合物较敏感,星耳石敏感性则较低。盐酸四环素溶液对仔、稚鱼耳石的标记效果很差,浸泡液浓度为100 mg/L和120 mg/L时,仅能在微耳石上检测到较弱的荧光标记,而150 mg/L及以上浓度的浸泡液对稚鱼有较高的致死作用。因此,茜素络合物是对胭脂鱼早期鱼苗进行化学标记比较合适的荧光物质,而盐酸四环素不适于标记该鱼的耳石。在对标记鱼进行荧光检测时,矢耳石和微耳石是适合的材料。

关键词:胭脂鱼;仔、稚鱼;耳石;茜素络合物;盐酸四环素;标记

中图分类号:Q95,Q81 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2005)04-60-06

Otolith Marking of Larval and Juvenile Chinese Sucker with Fluorescent Substances

FU Zi-Dong LI Jing YUE Bi-Song SONG Zhao-Bin

(College of Life Sciences, Sichuan University, Key Laboratory of Bio-resources and Bio-environment, Ministry of Education, Chengdu 610064, China)

Abstract Larval and juvenile Chinese Sucker(*Myxocyprinus asiaticus*) were immersed in 50 mg/L, 100 mg/L, 150 mg/L, 200 mg/L, 250 mg/L alizarin complexone (ALC) and 50 mg/L, 100 mg/L, 120 mg/L, 150 mg/L, 200 mg/L, 250 mg/L tetracyclin-hydrochlorid (TCHC) solutions for 24 h, respectively. Otoliths of larvae and juveniles were removed and examined under the fluorescent microscope after being reared for a period of time. Fluorescent zones were observed in otoliths of larvae and juveniles immersed in different ALC solutions, and the marks were very evident in 100 mg/L, 150 mg/L and 200 mg/L groups. The marking rate was very low in 50 mg/L group, and the mortality was very high in 250 mg/L group. At the same solution concentration, the fluorescent reaction intensity in otoliths decreased with increasing of fish age. In the three pairs of otoliths, the marking in sagitta and lapillus was very strong, while the marking in asteriscus was very poor. Fluorescent zones were also observed in otoliths of larvae and juveniles immersed in 100 mg/L and 120 mg/L TCHC solutions, but the marking rates were relatively low and the marks were very weak. When immersed in 150 mg/L, 200 mg/L and 250 mg/L TCHC solutions, the mortality of larvae and juveniles was relatively high. So ALC is a suitable substance for otolith marking of Chinese Sucker fry, while TCHC is unsuitable.

Key words: *Myxocyprinus asiaticus*; Larva and juvenile; Otolith; Alizarin complexone; Tetracyclin-hydrochlorid; Marking

利用荧光物质在鱼类耳石上沉积特殊生长轮的耳石标记法(otolith marking)对早期鱼苗标记相当理想,这一点在香鱼(*Plecoglossus altivelis*)、大麻哈鱼(*Oncorhynchus keta*)和大鳞大麻哈鱼(*O. tshawytscha*)等鱼类中已得到证实^[1,2]。该

基金项目 国家自然科学基金(No.30300040);

*通讯作者 E-mail: zhsong343@sohu.com;

第一作者介绍 付自东,男,硕士研究生,研究方向:鱼类生态学 E-mail: fzd1973@163.com。

收稿日期:2004-12-05,修回日期:2005-05-12

方法能使鱼体产生可资识别的标记,一次性标记的鱼苗数量较大,对标记后鱼苗的存活和生长影响小,因此是实现人工放流种群大规模标记(mass marking)的理想手段,为鱼类的资源量调查、人工放流种群识别、放流后的生活习性跟踪监测以及放流增殖的效果评价等工作提供了新的途径。曾有学者将荧光浸泡标记用于鱼类耳石日轮确证^[3-5]及人工放流的标记^[6],但对浸泡方法和标记效果的研究较少,文献见于对稀有鮡鲫(*Gobiocypris rarus*)、彭泽鲫(*Carassius auratus pengze var.*)和鳊鱼(*Elopichthys bambusa*)仔、稚鱼的浸泡标记^[3,7]。

胭脂鱼(*Myxocyprinus asiaticus*)属鲤形目(Cypriniformes)胭脂鱼科(Catostomidae),是我国特有的珍稀鱼类,被列为国家二级水生野生保护动物。本文采用茜素络合物(alizarin complexone, ALC)和盐酸四环素(tetracyclin-hydrochlorid, TCHC)溶液浸泡标记胭脂鱼仔、稚鱼耳石,寻找最佳的标记时期和浸泡浓度,以期建立大规模标记该

鱼早期鱼苗的化学方法,用于调查其天然资源量,以及有效评价人工放流的增值效果,这将为最终解决我国珍稀鱼类天然资源的保护与恢复的难题提供科学原理和方法,为我国珍稀鱼类的多样性保护研究提供可靠依据,具有广泛的应用前景。

1 材料与方法

1.1 实验鱼来源及饲养管理 2004年4月2日,从四川省农科院水产研究所采集受精后3 d的胭脂鱼受精卵500粒,带回实验室后在20℃水温下孵化获得胭脂鱼仔鱼。将孵化后的仔鱼饲养在60 cm × 50 cm × 37 cm的塑料水箱中,饲养用水为曝气24 h以上的自来水,每天早晚各换水一次,每次换水约2/3,清除脏物,并测量早晚水温。仔鱼开口饵料为鸡蛋黄,9日龄后饲喂轮虫、桡足类和枝角类,20日龄后投喂切碎的水蚯蚓。实验期间不控温,水温变动范围为16.5~27.0℃。

表1 荧光物质浸泡标记实验方案

Table 1 Different groups of immersing experiments using solution of fluorescent substance

荧光物质 Fluorescent substance	标记日期 Marking date (year-month -date)	日龄 Age (d)	体长 Body length (mm)	浸泡液浓度 Immersing concentration (mg/L)	浸泡持续时间 Immersing duration (h)	浸泡温度 Immersing temperature (℃)	饲养持续时间 Rearing days after immersing (d)	样本数 Sampling number (n)			
茜素络合物 Alizarin complexone	2004-04-16	12	13.7~14.4	50	24	17	21	10			
				100	24	17	9~35	10			
				150	24	17	80	10			
				200	24	17	35	10			
				250	24	17		10			
				200	24	26	20	5			
	2004-04-23	19 ^a	15.9~16.5	200	24	26	20	5			
				200	24	26	20	5			
				2004-05-11	37	13.8~21.2	100	24	24.1	45~47	10
				2004-06-01	58	22.5~27.2	150	24	22.9	25	10
2004-07-01	88	32.5~46	150	24	25	13~17	10				
盐酸四环素 Tetracyclin- hydrochlorid	2004-05-10	36	14.1~17.1	50	24	23.5		10			
				100	24	23.5		10			
				120	24	23.5	12	10			
				150	24	23.5		10			
				200	24	23.5		10			
				250	24	23.5		10			

a. 仔鱼12日龄时已用100 mg/L ALC溶液浸泡标记; b. 仔鱼12日龄时已用200 mg/L ALC溶液浸泡标记。

a. Larvae were immersed in 100 mg/L ALC solution when they were 12 days old; b. Larvae were immersed in 200 mg/L ALC solution when they were 12 days old.

1.2 试剂及浸泡液配制 实验用盐酸四环素和茜素络合物为分析纯粉剂,分别为德国生产和国药集团上海化学试剂公司分装。用曝气自来水按实验方案配制不同浓度的浸泡液(表 1)。

1.3 实验方案 荧光物质浸泡液浓度、实验鱼大小、浸泡持续时间,以及浸泡液温度等见表 1。浸泡结束后将鱼苗移入容积为 3.5 L 的圆形搪瓷缸中饲养一段时间后取出,保存在无水乙醇中。

1.4 耳石摘取与检测 将保存后的鱼苗置于双筒解剖镜下,用解剖针剖开鱼苗的听囊,取出矢耳石、微耳石和星耳石,经无水乙醇清洗、晾干,二甲苯透明后,用中性树胶封于载玻片上保存。在 Olympus 荧光显微镜下,分别用紫外、蓝、黄绿激发光观察检测耳石上的荧光标记效果,参照宋昭彬等的方法^[3],按无、可见、明显、鲜艳 4 个等级记录荧光反应强度,采用由计算机、Leica DC100 数码照相机和 Leica DM IRB 荧光显微镜组成的照相系统进行拍照。

2 结果

2.1 浸泡液的安全浓度 茜素络合物浸泡液的浓度为 50~200 mg/L 时,仔鱼成活率为 100% ($n = 10$),在浸泡后的饲养阶段,未发现死亡个体;当浸泡液浓度为 250 mg/L 时,仔鱼成活率仅为 10% ($n = 10$)。盐酸四环素浸泡液的浓度为 50~120 mg/L 时,稚鱼成活率为 100% ($n = 10$);浸泡液浓度为 150 mg/L 时,稚鱼成活率为 40% ($n = 10$);浸泡液浓度为 200 mg/L 及以上时,稚鱼死亡率达到 100% ($n = 10$)。

2.2 标记效果

2.2.1 茜素络合物溶液浸泡标记效果 分别用紫外、蓝、黄绿激发光观察经茜素络合物溶液浸泡标记的胭脂鱼仔、稚鱼耳石,在 3 种激发光下都能检测到荧光标记环,ALC 荧光标记环均呈橘红色,但荧光反应强度和颜色的深度不同,在紫外激发光下,标记环呈淡橘红色,蓝激发光下较深,黄绿激发光下最深(图版 I:1~3)。通过对不同激发光下荧光效果的比较表明,黄绿激发光下的荧光反应最强。因此,在检测胭脂

鱼耳石上的 ALC 标记环时,适宜的激发光为黄绿光。以下相关标记效果的统计数据均为在黄绿激发光下的观察结果。

当浸泡液浓度为 50、100、150、200 mg/L 时,12 日龄仔鱼微耳石的标记率分别为 30%、100%、100%、100%,矢耳石的标记率分别为 20%、100%、100%、100%;250 mg/L 组由于 90% 个体已经死亡,未统计其结果;而 12 日龄仔鱼的星耳石还未形成,因此星耳石上没有检测到荧光标记环。鱼龄对标记率有一定影响,用相同浓度的溶液浸泡,随着鱼龄的增加,耳石标记率可能降低。当浸泡液浓度为 100 mg/L 时,12、19 和 37 日龄鱼苗微耳石的标记率分别为 100%、100% 和 80%,矢耳石的标记率分别为 100%、100% 和 75%;当浸泡液浓度为 150 mg/L 时,12、58 和 88 日龄鱼苗微耳石标记率分别为 100%、100% 和 0%,矢耳石的标记率分别为 100%、70% 和 0%。在所有标记组中,仅在 19 和 37 日龄 100 mg/L 浓度组检测到星耳石上存在荧光标记环,标记率分别为 50% 和 15%,标记环都很模糊。

随着浸泡液浓度上升,仔鱼耳石上的荧光反应强度增加,标记为鲜艳的样品出现频率增加(表 2)。12 日龄 150 mg/L 组耳石荧光标记强度显著高于 100 mg/L 组(χ^2 -检验: $P < 0.001$),200 mg/L 组耳石荧光标记强度与 150 mg/L 组无差异(χ^2 -检验:微耳石, $P < 1$;矢耳石, $P < 0.154$)。浸泡液浓度一定时,鱼苗日龄越大,耳石上的荧光反应强度越弱,标记为明显和鲜艳的样品出现频率下降(表 2)。浓度为 100 mg/L 时,12 日龄和 37 日龄鱼苗耳石上荧光标记强度存在显著差异(χ^2 -检验: $P < 0.001$)。浓度为 150 mg/L 时,12 和 58 日龄鱼苗耳石上荧光标记强度也存在显著差异(χ^2 -检验: $P < 0.001$)。

此外,分别采用 200 mg/L + 200 mg/L ($n = 5$)、100 mg/L + 200 mg/L ($n = 5$) 浓度组合对同一批鱼苗进行两次浸泡标记后发现,前者 80% 微耳石的内标记环比外标记环荧光反应强(图版 I:4),后者 85% 微耳石的外标记环比内标记环

表 2 不同荧光反应强度的茜素络合物标记环出现频率

Table 2 Frequency of ALC marks with different fluorescent intensity on otoliths

浸泡液浓度 Immersing concentration(mg/L)	日龄 Age (d)	耳石 Otolith	无 No mark (%)	可视 Light mark (%)	明显 Good mark (%)	鲜艳 Bright mark (%)	样本数 Sampling number (n)
100	12	L	0	0	85	15	20
		S	0	0	70	30	20
	37	L	0	30	40	30	20
		S	25	55	5	15	20
150	12	L	0	0	10	90	20
		S	0	0	10	90	20
	58	L	0	100	0	0	20
		S	30	70	0	0	20
200	12	L	0	0	10	90	20
		S	0	0	5	95	20

L:微耳石; S:矢耳石。L:Lapillus; S:Sagitta.

荧光反应强(图版 I:5)。

2.2.2 盐酸四环素溶液浸泡标记效果 分别用紫外、蓝、黄绿激发光观察经盐酸四环素浸泡标记的胭脂鱼仔、稚鱼耳石,结果表明其适宜的激发光为蓝光,在此激发光下,能检测到微弱的淡黄色荧光标记环(图版 I:6)。

盐酸四环素对仔、稚鱼耳石的标记率较低,且标记效果很差。浸泡液浓度为 50 mg/L 组的耳石上未检测到荧光标记环;浓度为 100 mg/L 组 20% ($n = 20$) 的微耳石上检测到标记环存在,但荧光反应极弱;浓度为 120 mg/L 组微耳石的标记率为 30% ($n = 20$),标记环的荧光反应强度亦很弱,与 100 mg/L 组无明显差异。两组中,矢耳石和星耳石上均未观察到有荧光标记环。

3 讨论

3.1 适于检测荧光标记的激发光 在检测鱼类耳石上的荧光标记时,研究者多用紫外激发光源观察。在紫外激发光下,稀有鮟鲫、彭泽鲫和鳊鱼仔、稚鱼耳石上的茜素络合物标记环呈橘红色,盐酸四环素标记环呈黄色^[3,7],香鱼耳石上的茜素络合物标记环为深粉红色^[1]。本实验中,分别用紫外光、蓝光和黄绿光为激发光源进行观察,在胭脂鱼仔、稚鱼耳石上都检测到橘红色的茜素络合物标记环,但每种激发光下的荧光反应强度不一样,以黄绿光下最强,紫外光

下最弱;在蓝激发光下,能检测到淡黄色的盐酸四环素标记环,而其余两种激发光下未能检测到四环素荧光标记。可见,对不同的种类,荧光标记检测的最适激发光源可能不同,胭脂鱼耳石茜素络合物标记的最适检测光源为黄绿激发光,盐酸四环素标记的最适检测光源为蓝激发光。

3.2 浸泡试剂的选择 与常规标记方法相比较,通过含荧光物质的溶液浸泡标记耳石,可以在短时间内实现鱼苗的大规模标记,最大限度地降低人工操作对鱼苗的影响。目前常采用盐酸四环素、茜素络合物和钙黄绿素(calcein)等对仔、稚鱼进行荧光浸泡标记,对仔、稚鱼进行浸泡时,适宜的荧光物质和最佳浸泡浓度等都可能因鱼的种类、规格和实验条件而异^[3]。

盐酸四环素是较早用来对鱼类进行荧光标记的试剂之一,但一些研究表明,其溶液对鱼体有较大的毒性^[3,7]。Secor 等用 250 和 350 mg/L 的氧四环素(oxytetracycline)溶液浸泡条纹石鲈(*Morone saxatilis*),浸泡时间分别为 2 h 和 3 h,结果显示浸泡过和未浸泡的仔鱼死亡率没有明显差异^[6]。欧阳斌等用盐酸四环素浸泡稀有鮟鲫,浓度 150 ~ 250 mg/L,持续时间 12 h,均出现 100% 死亡率;而浸泡彭泽鲫时,浓度 50 ~ 250 mg/L,时间 12 ~ 24 h,100% 成活,且标记效果较好,浓度为 300 ~ 400 mg/L,成活率为 50% ~

90%，浓度大于 450 mg/L 时，死亡率为 100%^[7]。在本实验中用盐酸四环素溶液对胭脂鱼仔、稚鱼的浸泡实验发现，当浸泡浓度达到 150 mg/L，持续 24 h 时，即出现较高的死亡率（60%）；浸泡浓度达到 200 mg/L 时，鱼苗在浸泡期间全部死亡。可见，盐酸四环素毒性的大小可能因种类和浸泡持续时间的差异而不同。与稀有鮠鲫类似，胭脂鱼对盐酸四环素也比较敏感，且其标记效果很差，标记率低。因此，盐酸四环素不适用于作胭脂鱼早期鱼苗的耳石荧光浸泡标记。

茜素络合物在 100 ~ 200 mg/L 的浓度范围内，胭脂鱼仔鱼微耳石和矢耳石都达到了 100% 的标记率，且成活率为 100%；同时，虽然标记环的荧光反应强度有随着浓度增加而增强的趋势，但 150 mg/L 和 200 mg/L 的荧光反应强度没有显著差异。因此，茜素络合物是标记胭脂鱼早期鱼苗的合适荧光物质，150 mg/L 为浸泡液的适宜浓度。以往的研究结果也表明茜素络合物对鱼类耳石具有较好的标记效果^[1,3,5]。

3.3 影响标记效果的因素 荧光标记效果同荧光物质浓度和标记个体年龄有关。当茜素络合物浸泡液在 50 ~ 200 mg/L 的浓度范围内时，随着浸泡浓度上升，胭脂鱼仔、稚鱼耳石上标记环荧光反应强度增加。当浸泡液浓度相同时，同龄不同个体之间标记环荧光反应强度差别不大，不同日龄阶段标记效果则相差很大，低龄个体标记环荧光反应较强，可以认为随着鱼龄的增大，耳石对荧光物质的沉积率降低。Secor 等认为，不同鱼龄个体之间这种标记效果上的差异也许和代谢有关，低龄鱼比高龄鱼有更高的代谢率，吸收荧光物质更多一些^[6]。

通过对不同年龄组标记率和荧光反应强度的比较发现，同一个体不同耳石对荧光物质的沉积率可能不同。微耳石对茜素络合物沉积率较高，其次为矢耳石，星耳石最低。

由于标记效果同荧光物质、浸泡浓度和鱼龄等因素相关，因此在对胭脂鱼早期鱼苗进行荧光浸泡标记时应充分考虑这些因素。本实验表明，在仔鱼期，选择 150 mg/L 的茜素络合物进行 24 h 浸泡标记是恰当的；同时考虑到胭脂鱼放流规格上的要求，进一步的工作应着手找到一个对胭脂鱼稚鱼和幼鱼恰当的标记浓度，同时对浸泡时间也应作进一步的研究，搞清楚不同浸泡时间梯度下的标记效果，以期最终解决胭脂鱼人工放流鱼苗的化学标记问题。

参 考 文 献

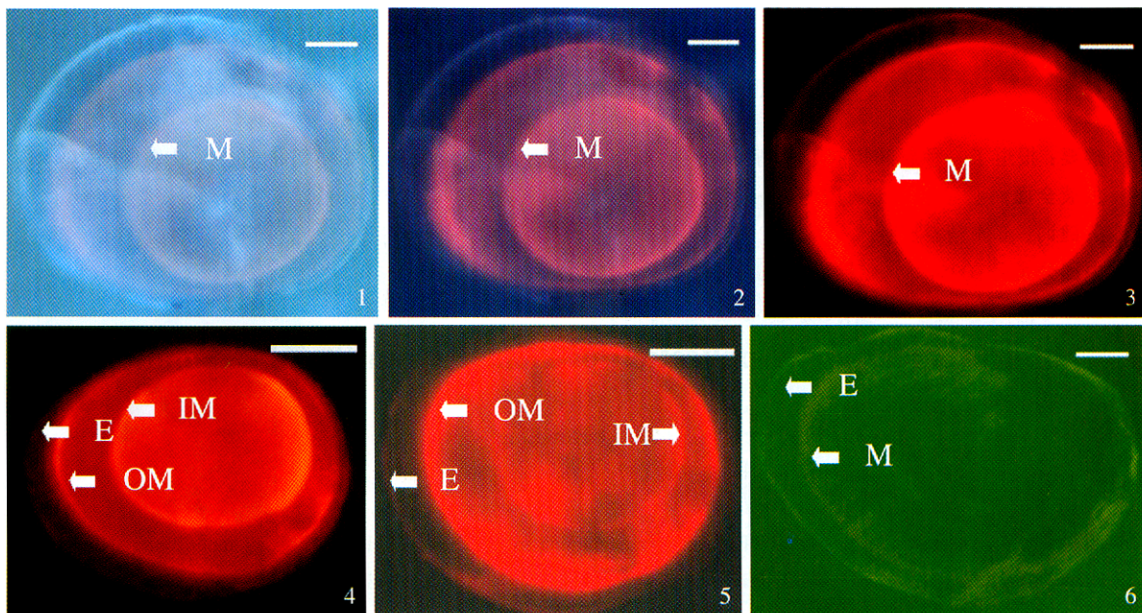
- [1] Tsukamoto K. Otolith tagging of ayu embryo with fluorescent substances. *Nippon Suisan Gakk*, 1988, **54**:1 289 ~ 1 295.
- [2] Volk E C. Inducement of unique otolith banding patterns as a practical means to mass-marking juvenile pacific salmon. *Am Fish Soc Symp*, 1990, **7**: 203 ~ 215.
- [3] 宋昭彬, 曹文宣. 鱧鱼仔稚鱼耳石标记和其日轮确证. *水生生物学报*, 1999, **23**(6): 677 ~ 682.
- [4] 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. *大连水产学院学报*, 1989, **4**: 58 ~ 62.
- [5] Al-Husaini M, Al-Ayoub S, Dashti J. Age validation of nagroor, *Pomadasys kaakan* (Cuvier 1830) (Family: Haemulidae) in Kuwaiti waters. *Fish Res*, 2001, **53**: 71 ~ 78.
- [6] Secor D H, Miller G W, John M D. Immersion marking of larval and juvenile hatchery-produced striped bass with oxytetracycline. *T Am Fish Soc*, 1991, **120**: 261 ~ 266.
- [7] 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. *水生生物学报*, 1999, **23**(4): 324 ~ 329.

付自东等:用荧光物质浸泡标记胭脂鱼仔、稚鱼耳石

图版 I

FU Zi-Dong *et al.*: Otolith marking of larval and juvenile Chinese Sucker
with fluorescent substances

Plate I



1~3. 100 mg/L 茜素络合物溶液浸泡标记 12 日龄仔鱼微耳石; 4. 200 mg/L + 200 mg/L 茜素络合物溶液浸泡标记微耳石; 5. 100 mg/L + 200 mg/L 茜素络合物溶液浸泡标记微耳石; 6. 150 mg/L 盐酸四环素溶液浸泡标记 36 日龄稚鱼微耳石; 1. 紫外激发光下观察; 2,6. 蓝激发光下观察; 3~5. 黄绿激发光下观察; M: 标记环; IM: 内标记环; OM: 外标记环; E: 耳石边缘; 标尺 = 50 μm 。

1~3. Lapilli of larvae marked with 100 mg/L ALC solution when they were 12 days old; 4. Lapillus of larvae marked with 200 mg/L + 200 mg/L ALC solutions; 5. Lapillus of larvae marked with 100 mg/L + 200 mg/L ALC solutions; 6. Lapillus of juveniles marked with 150 mg/L TCHC solution when they were 36 days old; 1. Observed under UV light; 2,6. Observed under blue light; 3~5. Observed under yellow and green light; M: Mark; IM: Inner mark; OM: Outer mark; E: Edge of otolith; Bar = 50 μm .