

茜素络合物对半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*) 苗种耳石的染色标记效果*

徐永江^{1,2} 柳学周^{1,2①} 史 宝^{1,2} 翟介明³

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术国家实验室
海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071; 3. 莱州明波水产有限公司 烟台 261418)

摘要 采用茜素络合物(Alizarin Complexone, ALC)分别浸泡标记 70 d 和 170 d 半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)苗种耳石,设置了 5 个浓度组和 3 个时间梯度组。结果显示, ALC 对半滑舌鲷 70–170 d 苗种的耳石染色效果明显。综合考虑存活率和标记效果, ALC 浸泡标记半滑舌鲷苗种耳石的适宜浓度为 100 mg/L (36 h 浸泡处理)和 150 mg/L(24 h 浸泡处理)。相同浸泡时间下,随着 ALC 浓度的增加,耳石上标记信号强度增加,但实验鱼死亡率升高;相同浸泡浓度下,随着时间的增加,耳石上标记信号强度增加,实验鱼死亡率也会升高。对标记的 170 d 苗种进行养殖实验,每 30 d 取样矢耳石进行观察,发现 4 个月后实验鱼生长良好,且耳石荧光信号仍可清晰检测到,表明 ALC 在半滑舌鲷矢耳石上形成的荧光标记可长期存续,标记效果好。研究结果可为半滑舌鲷大规模标志放流及早期生活史研究提供群体身份识别技术支持。

关键词 茜素络合指示剂; 半滑舌鲷; 耳石; 标记效果

中图分类号 S917.4 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2016)06-0011-08

标记-回捕方法对研究鱼类的洄游、种群大小、生长率和行为等具有重要作用(Ricer, 1971)。耳石是鱼类生长和早期生活史研究的重要载体(Campana *et al*, 1985; Nielsen, 1992; Pannella, 1971; 杨青瑞等, 2007)。荧光染料标记鱼类耳石已被广泛使用, 荧光物质会在耳石上形成永久标记, 可应用于鱼类不同生活史阶段的相关研究(宋昭彬等, 1999)。硬骨鱼类的耳石位于鱼体内耳前庭区, 一共有 3 对耳石, 其中, 大的 1 对为矢耳石, 其余 2 对为星耳石和微耳石。Pannella(1971)提出鱼类日龄的概念, 此后耳石鉴定已成功应用于鱼类年龄鉴定(杨青瑞等, 2007)、生长分析(王菲等, 2010)、物种鉴别(Assis, 2003; 郭弘艺等, 2010)、近缘种鉴定(潘晓哲等, 2010)等研究领域, 取得了诸多研究进展。

鱼类耳石的主要成分为碳酸钙并含有有机物及

微量元素, 一旦形成, 很少发生再吸收现象, 比较稳定(高永华等, 2008)。同时, 因其可被荧光物质染色且可形成永久标记, 后来被广泛应用于鱼类的增殖放流回捕评估研究(Matsumura, 2000)。耳石标记具有操作简单、省时省力、对鱼类的存活和生长发育影响小等优点, 同时荧光物质标记不容易被破坏和冲洗, 所以在鱼类资源量调查、标记物种的放流识别、放流后生活习性跟踪调查、放流回捕及增殖效果评价等研究领域广泛应用(van Der Walt *et al*, 2003)。目前, 常用于耳石染色标记的荧光染料主要有盐酸四环素(Oxytetracycline, OTC)(Tsukamoto, 1995)、钙黄绿素(Calcein) (Wilson *et al*, 1987)、茜素络合物(Alizarin Complex-one, ALC) (Lang *et al*, 1993)、茜素红 S (ARS) (Unfer *et al*, 2013; Eckmann, 2003)。其中, ALC 因其使用安全性高、价格低廉和对耳石染色效果好等

* 国家鲆鲽类产业技术体系项目(CARS-50)、中央级公益性科研院所基本科研业务费(20603022016003)和国家国际科技合作专项项目(2013DFA31410)共同资助。徐永江, E-mail: xuyj@ysfri.ac.cn

① 通讯作者: 柳学周, 研究员, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2015-11-05, 收修改稿日期: 2016-01-05

优点成为最为常用的荧光染料之一, ALC 与钙离子螯合可形成猩红色荧光标记, 易于与耳石的自发荧光区别。另有研究表明, ALC 在耳石上形成的标记可以在显微镜自然光源下检测, 使标记检测更简单(Beckman *et al*, 1996; 何春林等, 2008)。

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)为我国近海常见的暖温性大型底栖鱼类(邓景耀等, 1988; 柳学周等, 2006)。近年来, 因过度捕捞和环境恶化引起其自然资源量不断下降, 已形不成渔获。2003年, 半滑舌鳎人工繁殖技术取得突破, 推动了养殖产业和资源增殖保护事业的快速发展。2006年以来, 我国开展了大规模的半滑舌鳎增殖放流活动, 为评估其放流增殖效果, 开发适宜的放流标志技术引起业界广泛关注。本研究利用 ALC 浸泡标记半滑舌鳎苗种耳石, 探索 ALC 适宜的浸泡时间和浸泡浓度, 以期建立高效的耳石荧光标记检测方法, 为半滑舌鳎标志放流和增殖效果评估提供群体身份识别技术支撑。

1 材料与方法

1.1 实验鱼来源及培育

本研究在山东莱州明波水产有限公司开展, 实验用半滑舌鳎苗种为该公司人工培育的健康苗种, 苗种色泽正常, 大小规则整齐, 健康活泼, 摄食良好。

使用 70 d (全长 3–4 cm) 和 170 d (全长 8–10 cm) 2 个规格的实验鱼各 1000 尾, 实验开始前实验鱼在底面积为 25 m² 的水泥池中暂养 7 d。实验鱼培育条件: 水温为 18–20℃、盐度为 28–30、pH 为 7.8–8.3、溶解氧 5 mg/L 以上。实验鱼投喂配合饲料, 投喂量为鱼体重的 2%–3%, 每日清理培育池 1 次。

1.2 ALC 浸泡处理方案

实验用 ALC 购自 Sigma 公司。ALC 实验液配制方法: 先将 ALC 溶于蒸馏水中, 再加入少量 KOH 增加 ALC 的溶解性, 配成浓度为 1000 mg/L 的 ALC 储备液(调节盐度至 32), 然后用储备液加曝气的海水稀释成不同浓度的浸泡液。ALC 设置 5 个浓度梯度: 0(对照组)、50、100、150、200 mg/L。用 NaHCO₃ 缓冲液调节溶液的 pH 值至 8。

实验容器为圆柱形塑料桶(半径 50 cm, 高 50 cm), 实验前用自然海水清洗实验容器 2 次, 然后用自然海水浸泡 24 h。使用 20 个圆柱形塑料桶(100 L), 按照数字顺序编号标记, 每个桶中放置 100 尾实验鱼。其中, 1–5 号桶放置 70 d 鱼苗, 设置 1 组重复; 6–10 号桶为 170 d 鱼苗, 设置 1 组重复。将实验鱼置入实

验容器前饥饿 24 h, 对所有盛有染色液的容器进行遮光处理, 以减少环境对鱼体可能造成的胁迫影响。

观察并记录鱼苗在 ALC 染色液中 12 h、24 h、36 h 的成活率情况, 及时挑拣出死鱼。实验鱼死亡的标准: 实验鱼腹部朝上翻转或者以异物接触鱼体未见反应。浸泡处理过程中向实验水体中充气增氧, pH 保持在 8 左右, 水温保持在 18–19℃。实验结束后, 将实验鱼转移至新鲜海水快速清洗, 去除鱼体上的染色液, 然后将实验鱼分别置于盛有新鲜海水的相同实验容器中, 代谢 4 h, 继续去除鱼体上的 ALC 染色液, 培育并观察实验鱼的行为变化。

1.3 生长影响评价

ALC 染色结束后, 将 150 mg/L 组的 170 d 实验鱼进行养殖, 以评价 ALC 染色处理对生长的影响, 以未染色处理的实验鱼作为对照组。使用容积为 2 m³ 的玻璃钢水槽进行养殖, 养殖时间为 4 个月。养殖条件: 水温为 17–20℃、盐度为 28–30、pH 为 7.8–8.3、溶解氧 5 mg/L 以上。养殖期间, 投喂人工配合饲料, 饱食投喂。日换水率为 100%, 每天清理实验容器底部。

记录实验鱼和对照组鱼在开始养殖和养殖结束时的全长和体重, 日瞬时生长速率按照如下公式计算:

$$G=100\times(\ln W_f-\ln W_i)/(t_f-t_i)$$

式中, W_i 为起始体重, W_f 为养殖结束后体重, t_f-t_i 为饲养时间(d), 以 G 值为指标评价耳石标记对生长的影响。

1.4 耳石摘取方法

在 ALC 浸泡处理过程中, 在 12、24 和 36 h 自各实验组分别取实验鱼 5–6 尾, 以 MS-222 (300 mg/L) 麻醉致死, 以无水乙醇整体保存固定, 用于观察耳石的荧光标记情况。

对 200 mg/L 组的养殖鱼, 每 30 d 取实验鱼 9 尾, 摘取耳石用于荧光标记观察, 持续至养殖实验结束。耳石摘取及处理方法: 首先将实验鱼以 MS-222 麻醉致死, 然后以剪刀和解剖针快速取出耳石, 区分微耳石和矢耳石, 将耳石先用双蒸水清洗, 再用无水乙醇脱水, 晾干后, 把耳石放在二甲苯溶液里浸泡透明。半滑舌鳎耳石为内凹形, 使用砂纸(5000 目)将耳石进行打磨处理, 最后用少量中性树脂把耳石固定在载玻片上进行观察。耳石打磨处理期间, 使用 NIKON SMZ800 体视显微镜连续观察, 保证耳石处理到最佳厚度和可视度。耳石打磨完成后, 使用 NIKON ECLIPS 80i 正置显微镜观察耳石, 利用自带图像处理软件 NIS-Elements AR 进行拍照和图像处理。

1.5 耳石荧光信号观察

为了清晰地观察 ALC 对耳石的染色效果, 分别用可见光、黄绿光、蓝光和紫外光源照射激发耳石样本, 各种光源的激发滤光片和阻挡滤光片的波长见表 1。

耳石的染色标记效果以 4 个等级来区分标记效果, 分别为无(-)、可见(+)、较明显(++)、明显(+++)。

表 1 用于观察耳石 ALC 标记的滤光片波长
Tab.1 The wave length of excitation filters and barrier filters used in the present study

光源 Light sources	波长 Wave length (nm)	
	激发滤光片 Excitation filter	阻挡滤光片 Barrier filter
绿光 Green light	510-560	590
蓝光 Blue light	450-490	520
紫外光 UV light	330-380	420

1.6 数据统计分析

本研究获得的实验鱼成活率数据为 2 个实验组的平均值, 日瞬时生长速率表达为平均值±标准差 (Mean±SD), 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 SPSS 16.0 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, 反之差异不显著。

2 结果

2.1 ALC 对耳石标记的适宜浓度和处理时间

研究发现, 在 50、100 mg/L ALC 浓度下, 浸泡 36 h 后, 70 d 和 170 d 鱼苗成活率均达到 100%。在 150 mg/L ALC 浓度下, 70 d 鱼苗在浸泡 24 h 时开始出现死亡, 至 36 h 实验结束时成活率为 90%; 170 d 鱼苗在浸泡 12 h 时开始出现死亡, 成活率为 93%, 至 36 h 实验结束时成活率仅为 76%。而在 200 mg/L ALC 浓度下, 70 d 和 170 d 鱼苗在 12 h 即全部死亡。结果表明, 随着浸泡浓度增大和苗种日龄的增加, 半滑舌鲷对 ALC 浸泡处理的耐受力降低(表 2), ALC 的处理浓度应控制在 150 mg/L 以内。

通过可见光和荧光镜检发现, 不同浓度 ALC 在不同作用时间下对耳石的荧光标记率不同。在 50 mg/L ALC 浓度条件下, 36 h 时对 70 d 和 170 d 苗种矢耳石和微耳石的荧光标记率均低于 47%, 同时荧光信号强度较弱。100 mg/L ALC 浓度下, 24 h 对 70 d 鱼苗矢耳石和微耳石的荧光标记率分别达 76%和 79%, 至 36 h

时对耳石的标记率达到 100%; 对 170 d 鱼苗矢耳石和微耳石在 24 h 的荧光标记率分别达 79%和 82%, 至 36 h 时对耳石的标记率也都达到 100%。150 mg/L ALC 浸泡处理时, 70 d 鱼苗矢耳石和微耳石的荧光标记率在 24h 时分别达 90%和 85%, 至 36 h 时对耳石的标记率达到 100%, 170 d 鱼苗矢耳石的荧光标记率在 12 h 已达 86%, 在 24 h 时均达 100%; 在 200 mg/L ALC 处理组, 70 d 和 170 d 鱼苗矢耳石和微耳石的荧光标记率均在 12 h 时就已达 100%, 同时, 耳石的荧光信号最强, 但苗种出现大量死亡。综合考虑 ALC 浸泡处理后鱼苗成活率、耳石荧光标记率、耳石标记效果等因素, 认为 ALC 对半滑舌鲷幼鱼耳石标记的适宜浓度应为 100-150 mg/L(表 2)。

同时发现, 借助于蓝光、黄绿光和紫外等荧光手段对耳石 ALC 标记效果的检测更容易辨识, 可提高耳石标记的检出效率。另外, 无论是 70 d 组还是 170 d 组鱼苗, 不同浓度的 ALC 浸泡处理后矢耳石的荧光信号强度总体强于微耳石, 因此, 选择矢耳石作为观察对象较为适宜。

2.2 ALC 适宜浸泡时间

当 ALC 浸泡处理时间为 12 h 时, 可见光和荧光下均可发现耳石荧光染色信号, 但效果不明显。处理 24 h 时, 无论是可见光下还是荧光下都有较好的耳石染色信号, 处理 36 h 时, 虽然标记的荧光信号强度随着浸泡时间增加而增强, 但 24 h 和 36 h 的荧光反应强度没有显著差异, 反而死亡率随时间的延长呈上升趋势(表 2), 因此, ALC 浸泡处理半滑舌鲷苗种的适宜时间以 24 h 为宜。

2.3 ALC 对耳石染色效果及保持时间

本研究发现, 茜素络合物对半滑舌鲷耳石的染色效果较好, 在显微镜下观察容易辨识标记, 又能长时间保留染色效果。

使用蓝光、黄绿光和紫外光检查实验鱼耳石发现, 蓝光对染色耳石观察的效果最佳, 其次为黄绿光, 再次为紫外光(图 1)。对实验鱼自实验开始连续 4 个月进行耳石取样, 发现各取样月份实验鱼耳石的染色信号强度差异不大, 即使在第 4 个月其信号强度与第 1 个月时并无明显差异(图 1), 表明茜素络合物耳石的染色效果较为持久。

2.4 ALC 处理对生长的影响评价

在 4 个月的养殖实验中, ALC 实验组和对照组实验鱼未出现死亡。单因素方差分析表明, 养殖过程

表 2 不同浓度 ALC 对 2 种规格鱼苗在不同浸泡时间条件下的标记效果

Tab.2 Marking effects of ALC at different concentrations on two sized tongue sole juveniles under different treatment duration

浸泡液浓度 Treatment concentration (mg/L)	样本数 Fish number (ind)	标记 日龄 Fish age(d)	浸泡时间 Treatment duration (h)	成活率 Survival rate(%)	矢耳石 Sagitta				微耳石 Asteriscus			
					标记率(%)		标记强度		标记率(%)		标记强度	
					可见光	荧光	可见光	荧光	可见光	荧光	可见光	荧光
					Visible light	Fluorescent light	Visible light	Fluorescent light	Visible light	Fluorescent light	Visible light	Fluorescent light
50	100	70	12	100	0	12	-	+	0	11	-	+
100	100			100	23	50	-	+	28	57	+	+
150	100			100	65	90	+	++	65	85	+	++
200	100			0	100	100	++	+++	100	100	+	++
50	100		24	100	0	33	-	+	0	23	-	+
100	100			100	51	76	+	++	52	79	+	++
150	100			97	100	100	++	+++	100	100	++	++
200	100			0	100	100	+++	+++	100	100	+++	+++
50	100		36	100	0	41	+	++	0	46	-	+
100	100			100	100	100	++	+++	91	100	++	+++
150	100			90	100	100	++	+++	100	100	++	+++
200	100			0	100	100	+++	+++	100	100	+++	+++
0(对照组 Control group)	100		36	100	0	0	-	-	0	0	-	-
50	100	170	12	100	0	9	-	++	0	10	-	++
100	100			100	26	54	-	++	19	51	-	+
150	100			93	62	86	+	++	59	83	+	++
200	100			0	100	100	+	+++	89	100	+	++
50	100		24	100	2	31	-	++	2	35	-	+
100	100			100	45	79	+	++	49	82	+	++
150	100			89	100	100	+	+++	100	100	++	++
200	100			0	100	100	+++	+++	100	100	+++	+++
50	100		36	100	3	42	-	++	2	45	-	+
100	100			100	89	100	+	++	100	100	+	++
150	100			76	100	100	++	+++	100	100	++	+++
200	100			0	100	100	+++	+++	100	100	+++	+++
0(对照组 Control group)	100		36	100	0	0	-	-	0	0	-	-

中 ALC 实验组与对照组间在全长、体重方面无显著差异($P>0.05$)(表 3), 可见 ALC 标记对半滑舌鳎苗种的养殖生长无明显影响。

3 讨论

3.1 耳石标记指示剂的选择

近年来, 在海洋鱼类的耳石标记所使用的指示剂中, ARS 和 ALC 已经逐渐取代了 OTC 和钙黄素, 其原因主要在于 ARS 和 ALC 对鱼体造成的损害较小, 标记后鱼类食用安全性高, 标记部位产生相对较弱的自发荧光。而 OTC 是一种抗生素, 且 OTC 随盐度的

增大, 游离 OTC 与钙结合, 导致 OTC 标记效果衰退, 不适宜标记海水鱼类耳石。

不同鱼类对荧光标记物的敏感性不一样, 随之带来的标记效果也不一样。Tsukamoto 等(1998)用一些小型鲤科鱼类的仔稚鱼进行 ALC 耳石标记实验, 表明产生可检测标记的 ALC 适宜浓度为 200 mg/L 或者更高。而欧阳斌等(1999)报道, 用 ALC 浸泡标记鮰鲫(*Gobiocypris rarus*)和彭泽鲫(*Carassius auratus* var. *Pengze*)时, 150 mg/L 浓度时出现鱼体死亡, 200 mg/L 时鱼体全部死亡。本研究发现, 利用 ALC 浸泡标记半滑舌鳎时, 100 mg/L 组未发生死亡, 而 150 mg/L

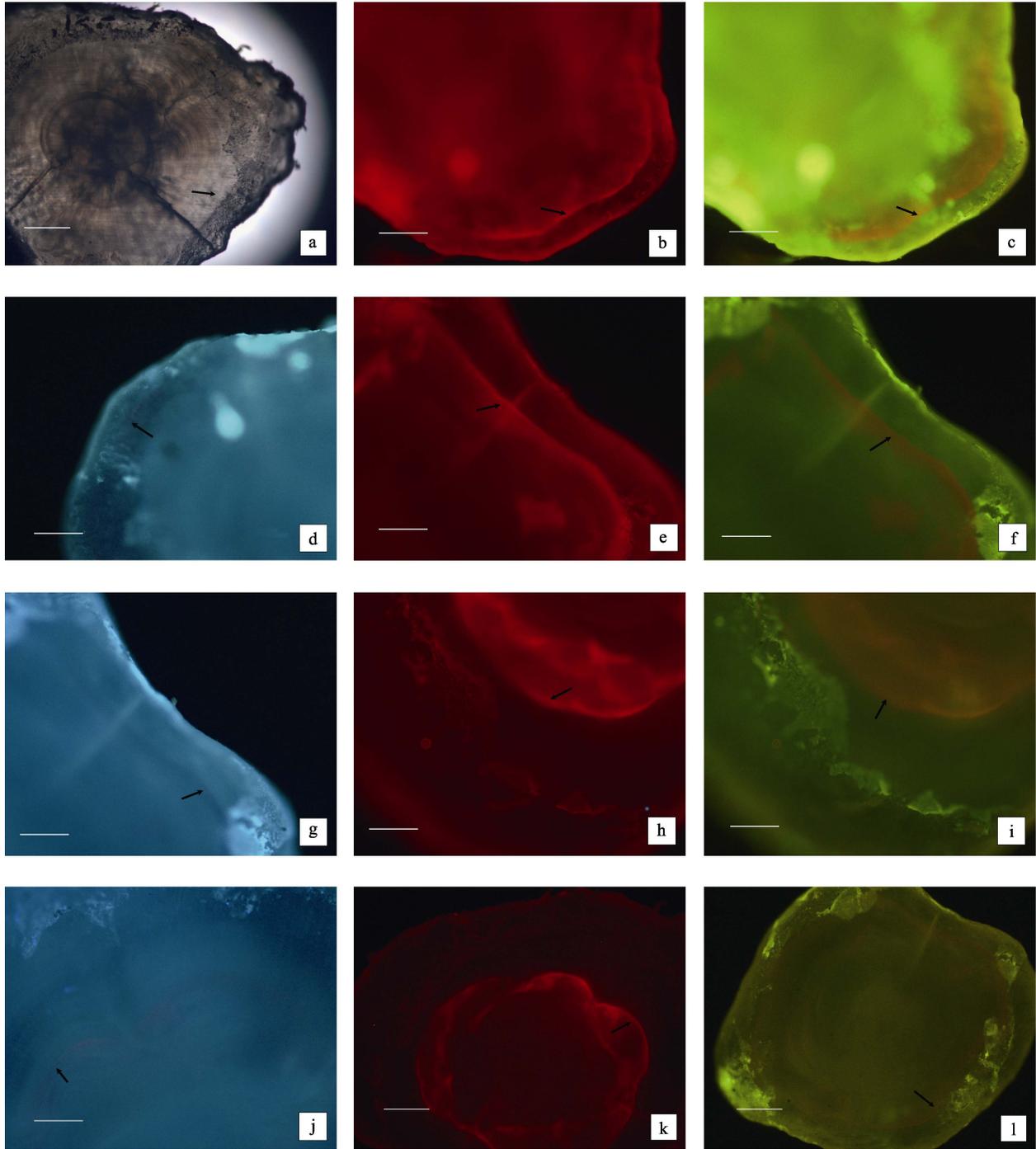


图 1 ALC 对半滑舌鳎耳石的标记效果

Fig.1 Marking effects of ALC on otoliths of juvenile tongue sole

a: 自然光下耳石整体; b: 标记后 1 个月耳石(黄绿光); c: 标记后 1 个月耳石(蓝光); d: 标记后 1 个月耳石(紫外光); e: 标记后 3 个月耳石(黄绿光); f: 标记后 3 个月耳石(蓝光); g: 标记后 3 个月耳石(紫外光); h: 标记后 4 个月耳石(黄绿光); i: 标记后 4 个月耳石(蓝光); j: 标记后 4 个月耳石(紫外光); k: 标记后 4 个月耳石整体观(黄绿光); l: 标记后 4 个月耳石整体观(蓝光)(注: 图 1-a、k、l 标尺为 500 μm , 其他图片标尺为 250 μm , 图中箭头示荧光标记部位)

a. unmarked sagittae; b. marked sagittae after one month (green light); c. marked sagittae after one month (blue light); d. marked sagittae after one month (UV light); e. marked sagittae after three months (green light); f. marked sagittae after three months (blue light); g. marked sagittae after three months (UV light); h. marked sagittae after four months (green light); i. marked sagittae after four months (blue light); j. marked sagittae after marked four months (UV light); k. whole marked sagittae after four months (green light); l. whole marked sagittae after four months (blue light) (Note: Bars indicated 500 μm in figures 1-a, k, l, and 250 μm in other figures. The arrows indicated marking sites)

表3 150 mg/L ALC 处理对 170 d 半滑舌鲷鱼苗生长的影响
Tab.3 Effects of ALC of 150 mg/L on the growth of tongue sole juveniles

类别 Groups	实验开始 Beginning of experiment		实验结束 End of experiment (120 d)		日瞬时增长率 Daily instantaneous growth rate(%)
	全长 Total length(cm)	湿重 Wet weight(g)	全长 Total length(cm)	湿重 Wet weight(g)	
对照组 Control group	9.35±0.39	3.95±0.37	15.15±0.26	34.93±1.71	2.44±0.45
实验组 Experimental group	9.28±0.38	4.05±0.34	15.18±0.55	35.15±2.67	2.39±0.36

出现少量死亡, 200 mg/L 浓度时鱼苗则全部死亡, 表明高浓度 ALC 可造成半滑舌鲷苗种较高的死亡率。同时发现, ALC 浓度在 100–200 mg/L 时均能对半滑舌鲷幼鱼矢耳石和微耳石产生良好的标记效果, 且标记效果随着浸泡时间的延长而增强, 但浸泡时间为 24 h 和 36 h 时的标记效果差异不显著。另外, 实验鱼死亡率与浸泡时间和浸泡浓度成正比关系, 在 200 mg/L ALC 浓度下实验鱼死亡率达 100%, 150 mg/L ALC 浸泡 24 h 时 2 种规格鱼苗死亡率仅为 11% 和 3%。结果表明, ALC 适合浸泡标记半滑舌鲷耳石, 其适宜标记浓度为 100–150 mg/L, 适宜标记时间为 24 h。

本研究发现, 随着 ALC 浓度增大和浸泡时间延长, 耳石标记效果逐渐增强(表 2), 这与 Liu 等(2009)、Katayama 等(2007)对褐牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)的研究结果一致。Liu 等(2009)研究发现, ALC 对褐牙鲈浸泡标记的最佳浓度为 300 mg/L, ALC 标记组与对照组间在养殖过程中全长、湿重无显著差异。Lagardère 等(2000)研究了 ALC 对大菱鲈的标记最适浓度为 120 mg/L, 同时表明其对大菱鲈的生长无影响。在本研究中, 半滑舌鲷浸泡标记的最佳浓度在 100–150 mg/L 之间, ALC 实验组与对照组间在养殖过程中无显著差异, 这与 Lagardère 等(2000)的研究结果一致。而在 200 mg/L 浓度下, 死亡率达到了 100%, 与牙鲈的标记结果不同, 可能是由不同物种对荧光染料的适应性不同造成的。另外, 本研究还发现, ALC 对鳍条的染色效果也较好, 浸泡 3 个月的鳍条硬棘的染色效果清晰可见。

3.2 ALC 对耳石标记效果的影响因素

已有研究表明, 影响 ALC 对鱼类耳石标记效果的因素主要有鱼日龄(宋昭彬等, 1999)、荧光物质浓度(Tsukamoto *et al.*, 1989)、浸泡时间(Beckman *et al.*, 1996)。作者认为, 随着鱼日龄的增大, 标记效果逐渐降低, 荧光物质在鱼类耳石中沉积的原理是鱼的新陈代谢促使荧光物质随着碳酸钙进入耳石, 参加下一轮的碳酸钙沉积, 随着时间的增加, 带有荧光物质的碳酸钙沉积越来越多, 逐渐形成一个荧光环。鱼日龄

越大, 新陈代谢降低, 碳酸钙沉积随之减慢, 使得荧光环变小或变淡。本研究发现, ALC 对 70 d 鱼苗的标记效果好于 170 d 鱼苗。荧光物质浓度对标记效果有明显的影 响, 本研究中, 50 mg/L 和 100 mg/L ALC 虽能染色耳石, 但效果不明显。而 150 mg/L 和 200 mg/L ALC 染色效果则较为明显, 可见荧光物质浓度越高, 染色越明显。王正鲲等(2015)发现茜素络合物对唐鱼(*Tanichthys albonubes*)耳石染色的适宜浓度也随日龄增大而增加, 与本研究结果相似。赵亚鹏等(2013)利用茜素络合物标记滇池金线鲃(*Sinocyclocheilus grahami*)仔稚鱼耳石时同样发现, 在相同浸泡强度下, 20 日龄仔鱼耳石标记效果优于 90 日龄稚鱼, 其原因可能是低日龄苗种培育密度大, 对于荧光染料的利用率可能会高。影响标记效果的另外一个因素为浸泡时间, 浸泡时间越长, 染色效果越明显。但考虑到鱼体生理胁迫耐受力, 浸泡时间不宜过长。除此之外, 观察耳石之前对耳石的处理也是检测标记效果的重要原因, 半滑舌鲷耳石形状略显不同, 耳石中心位置突起对观察耳石、检测染色效果有很大影响, 需要对耳石进行打磨处理变薄, 从而更容易观察和检测。

Tsukamoto(1995)研究了马苏大马哈鱼(*Oncorhynchus masou*)经 ALC 浸泡标记后, 荧光标记的长期检测方法和标记保留时间, 表明马苏大马哈鱼耳石上形成的 ALC 荧光标记持续保留时间至少为 3 年。Liu 等(2009)利用茜素红对牙鲈耳石进行标记暂养 60 d 后, 也发现耳石荧光标记未出现消褪, 而本研究发现, 利用 ALC 浸泡标记半滑舌鲷苗种耳石后 120 d, 耳石上形成的荧光标记仍然清晰可见, 表明 ALC 对半滑舌鲷耳石的标记效果是长期保持的, 该标记方法可用于半滑舌鲷苗种的标志放流和增殖效果评估。

参 考 文 献

- 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. 生态学杂志, 2015, 34(1): 189–194
王菲, 程家骅, 罗海忠. 东海条石鲷仔鱼耳石日轮与生长的

- 关系. 中国水产科学, 2010, 17(2): 320–328
- 邓景耀, 孟田湘, 任胜民, 等. 渤海鱼类种类组成及数量分布. 海洋水产研究, 1988(9): 10–98
- 杨青瑞, 刘建虎, 吴强. 三峡水库太湖新银鱼耳石日轮与生长的研究. 淡水渔业, 2007, 37(3): 59–62
- 何春林, 付自东, 严太明. 用荧光物质浸泡标记重口裂腹鱼仔鱼耳石. 四川动物, 2008, 27(3): 331–334
- 宋昭彬, 曹文宣. 鳙鱼仔稚鱼耳石的标记和其日轮的确证. 水生生物学报, 1999, 23(6): 677–682
- 欧阳斌, 常剑波. 荧光物质浸泡标记稀有鮎鲫和彭泽鲫仔、稚鱼. 水生生物学报, 1999, 23(4): 324–329
- 赵亚鹏, 潘晓赋, 杨君兴, 等. 滇池金线鲃(*Sinocyclocheilus grahami*)耳石的茜素红及茜素络合物标志. 动物学研究, 2013, 34(5): 499–503
- 柳学周, 孙中之, 马爱军, 等. 半滑舌鲷亲鱼培育及采卵技术研究. 海洋水产研究, 2006, 27(2): 25–32
- 高永华, 李胜荣, 任冬妮, 等. 鱼耳石元素研究热点及常用测试分析方法综述. 地学前缘, 2008, 15(6): 11–17
- 郭弘艺, 魏凯, 唐文乔, 等. 基于矢耳石形态特征的中国鲚属鱼类种类识别. 动物分类学报, 2010, 35(1): 127–134
- 潘晓哲, 高天翔. 基于耳石形态的鱈属鱼类鉴别. 动物分类学报, 2010, 35(4): 799–805
- Assis CA. The lagenar otoliths of Teleosts: their morphology and its application in species identification, phylogeny and systematics. J Fish Biol, 2003, 62(6): 1268–1295
- Beckman DW, Schultz RG. A simple method for marking fish otoliths with alizarin compounds. Trans Am Fish Soc, 1996, 125(1): 146–149
- Campana SE, Neilson JD. Microstructure of fish otoliths. Can J Fish Aquat Sci, 1985, 42(5): 1014–1032
- Wilson CA, Beckman DW, Dean JM, Charles A, Wilson DW. Calcein as a fluorescent marker of otoliths of larval and juvenile fish. Trans Am Fish Soc, 1987, 116(4): 668–670
- Eckmann R. Alizarin marking of whitefish, *Coregonus lavaretus* otoliths during egg incubation. Fish Manage Ecol, 2003, 10(4): 233–239
- Katayama S, Isshiki T. Variation in otolith macrostructure of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*): A method to discriminate between wild and released fish. J Sea Res, 2007, 57(2–3): 180–186
- Lagardère F, Thibaudeau K, Anras MLB. Feasibility of otolith markings in large juvenile turbot, *Scophthalmus maximus*, using immersion in alizarin-red S solutions. ICES J Mar Sci, 2000, 57(4): 1175–1181
- Lang JB, Bnxtton CD. Validation of age estimation in sparid fish using fluorochrome marking. Afr J Mar Sci, 1993, 13(1): 195–203
- Liu Q, Zhang XM, Zhang PD, et al. The use of alizarin red S and alizarin complexone for immersion marking Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Fish Res, 2009, 98(1–3): 67–74
- Matsumura Y. Otolith marking for eggs, larvae and juveniles of ocellate puffer *Takifugu rubripes* by alizarin complexone and tetracycline. Nippon Suisan Gakkaishi, 2000, 71: 307–317
- Nielsen LA. Methods of marking fish and shellfish. New York: American Fisheries Society Special Publication, 1992, 23: 37–38
- Pannella G. Fish otoliths: daily growth layers and periodical patterns. Science, 1971, 173(4002): 1124–1127
- Ricer WE. Methods for assessment of fish production in freshwater. Wiley-Blackwell Science Publication, 1971, 82–97
- Tsukamoto K, Kuwada H, Hirokawa J. Size-dependent mortality of red sea bream, *Pagrus major*, juveniles released with fluorescent otolith-tags in News Bay, Japan. J Fish Biol, 1989, 35(sA): 59–69
- Tsukamoto K. Use of otolith-tagging in a stock enhancement program for masu salmon, *Oncorhynchus masou*, in the Kaji River, Japan. Columbia: University of South Carolina Press, 1995, 403–422
- Unfer G, Pinter K. Marking otoliths of brown trout (*Salmo trutta* L.) embryos with alizarin red S. J Appl Ichthyol, 2013, 29(2): 470–473
- van Der Walt B, Faragher RA. Otolith marking of rainbow trout fry by immersion in low concentrations of alizarin complexone. N Am J Fish Manage, 2003, 23(1): 141–148

Alizarin Complexone Marking of Otoliths of Juvenile *Cynoglossus semilaevis*

XU Yongjiang^{1,2}, LIU Xuezhou^{1,2}^①, SHI Bao^{1,2}, ZHAI Jieming³

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071;

2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071; 3. Laizhou Mingbo Aquatic Co., Ltd., Yantai 261418)

Abstract As a result of the scaled stock enhancement of tongue sole, *Cynoglossus semilaevis*, since 2006 in China, millions of juveniles were released into the Bohai Sea and the Yellow Sea annually. However, it is difficult to evaluate the effectiveness of this operation because of a lack in efficient marking techniques. Here we tested the potential of alizarin complexone (ALC) as a marking material on tongue sole otolith. ALC solutions with 5 concentrations ranging from 0 to 200 mg/L in undiluted seawater were prepared. One hundred tongue sole juveniles of two sizes (70 d and 170 d post hatching) were randomly assigned into the 5 groups of ALC solutions and in each group the subjects were immersed into the solution for 12 hours, 24 hours, and 36 hours. Duplication was performed for each group. The results showed strong markings with ALC on otoliths of tongue soles. The optimal concentrations of ALC were 100 mg/L for 36-h marking and 150 mg/L for 24-h marking, which ensured both sound survival rate and strong marking signals. The marking quality (MQ) was assessed with scores from 0 to 3, and a score > 2 was regarded acceptable for adequate mark identification. The marking signals on the otolith were enhanced as the solution concentration increased, which however also increased the mortality rate. The marked juveniles (170 d) were cultured in indoor tanks for 4 months to determine how long the ALC marking could last. The marking signals were still clear at the end of the culture, and there was no difference in the growth between marked and unmarked subjects with the same size. These results indicated that ALC could form lasting signals on otoliths of tongue soles, and thus may be a useful tool in the evaluation of stock enhancement and the identification of tongue sole populations.

Key words Alizarin complexone; *Cynoglossus semilaevis*; Otolith; Marking effects

① Corresponding author: LIU Xuezhou, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn