

滇池金线鲃 (*Sinocyclocheilus grahami*) 耳石的茜素红及茜素络合物标志

赵亚鹏^{1,2}, 潘晓赋¹, 杨君兴^{1,*}, 陈小勇^{1,*}, 王晓爱^{1,2}, 李再云¹

1. 中国科学院昆明动物研究所 遗传资源与进化国家重点实验室, 云南 昆明 650223
2. 中国科学院大学, 北京 100049

摘要: 该文使用不同浓度梯度 (50~200 mg/L) 和浸泡时间 (4~24 h) 的茜素络合物 (ALC) 及茜素红 (ARS) 水溶液对 6、20 及 90 日龄滇池金线鲃 (*Sinocyclocheilus grahami*) 仔稚鱼进行标志。两种标志物均能在其耳石上形成深红色标记环带, 510~560 nm 绿色激发光下, 标志带呈猩红色荧光反应。50 mg/L ALC 或 ARS 溶液浸泡 6 日龄仔鱼 8 h、50 mg/L ALC 溶液或 100 mg/L ARS 溶液浸泡 20 日龄仔鱼 24 h 及 100 mg/L ALC 或 150 mg/L ARS 溶液浸泡 90 日龄稚鱼 24 h, 可见光下即可见清晰深红色标记带。50 mg/L ARS 或 ALC 溶液浸泡 6 日龄仔鱼 4 h 或浸泡 20、90 日龄仔鱼 24 h, 绿色激光下即绿色可见猩红色标记带。且以上浸泡条件均可保证 100% 标记率和存活率。

关键词: 耳石标志; 滇池金线鲃; 茜素络合物; 茜素红

中图分类号: Q959.46⁺8 文献标志码: A 文章编号: 0254-5853-(2013)05-0499-08

Use of alizarin red S and alizarin complexone for immersion marking *Sinocyclocheilus grahami*

Ya-Peng ZHAO^{1,2}, Xiao-Fu PAN¹, Jun-Xing YANG^{1,*}, Xiao-Yong CHEN^{1,*}, Xiao-Ai WANG^{1,2}, Zai-Yun LI¹

1. State Key Laboratory of Genetic Resources and Evolution, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming, 650223, China
2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: In the present study, we examined the potential uses of Alizarin complexone and Alizarin red S to mark *S. grahami* larvae and juveniles. Individuals of different ages (6 days, 20 days, 90 days) were immersed in four concentrations of a solution of each chemical (50, 100, 150 and 200 mg/L) for different periods of time (4–36 h). Marked individuals were euthanized 4–27 days after immersion, and the lapillus was removed and used to determine mark quality. After marking with 50–150 mg/L ALC and ARS, violet marks were visible under normal light, and scarlet fluorescent marks were visible under 510–560 nm green light. The clear marks under normal light were recorded, and a 100% survival rate was guaranteed under the following conditions: 6 day old larvae immersed in 50 mg/L ALC or ARS for 8h; 20 day old larvae immersed in 50 mg/L ALC or 100 mg/L ARS for 24h; 90 day old juveniles immersed in 100mg/L ALC or 150 mg/L ARS for 24 h.

Keywords: Otolith marking; *Sinocyclocheilus grahami*; Alizarin complexone; Alizarin red S

滇池金线鲃 (*Sinocyclocheilus grahami*) 隶属鲤形目 (Cypriniformes) 鲤科 (Cyprinidae) 金线鲃属 (*Sinocyclocheilus*), 分布于滇池流域, 为国家二级保护动物, 同时, 已被列入《中国濒危动物红皮书

(鱼类)》(Yue et al, 1998)。自上世纪 80 年代起, 由于环境污染、栖息地破坏及滥捕滥捞等原因, 滇池金线鲃数量急剧下降 (Chen et al, 2001)。目前, 滇池金线鲃的人工繁殖已经成功 (Yang et al,

收稿日期: 2013-03-04; 接受日期: 2013-05-16

基金项目: 全球环境基金会/世界银行项目 (GEF-MSP grant No. TF051795); 云南省发展和改革委员会项目; 中国科学院西部之光 (29200612D11033); 云南省应用基础研究面上项目 (2012FB183)

*通信作者 (Corresponding authors), E-mail: yangjx@mail.kiz.ac.cn; chenxy@mail.kiz.ac.cn

2007), 并于 2009 年开始实施人工增殖放流, 且放流规格通常不超过 5 cm。一些常规标志方法, 如穿刺标记(percutaneous tags)、可视性植入标记(visible implant tags)及线码标记(coded wire tags)等易对放流规格滇池金线鲃造成伤害且成本较高。利用能与钙结合的化学染料溶液浸泡早期鱼苗, 从而在耳石上形成相应标志环的耳石标记法, 能够一次性标记大量早期鱼苗, 操作简单, 对鱼体损伤小, 且标记形成后, 不会被代谢吸收, 理论上能保留终身(van der Walt & Faragher, 2003), 已被应用于香鱼(*Plecoglossus altivelis*)人工增殖放流(Tsukamoto, 1988)及珊瑚鱼类的种群生态学研究(Jones et al, 1999)。常用化学染料有: 茜素络合物(alizarin complexone, ALC)、茜素红(alizarin red S, ARS)及盐酸四环素(oxytetracycline, OTC)等, 由于对化学染料的耐受性和敏感性不同(Fu et al, 2005; Jin et al, 2011; Tsukamoto, 1988), 不同鱼种的最佳浸泡条件也不相同。本研究旨在寻找浸泡标记滇池金线仔稚鱼的最佳条件, 为其早期鱼苗的大规模标记提供技术支持, 并为放流后的评估工作奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验鱼来源及管理

6 日龄(60 尾)、20 日龄(60 尾)及 90 日龄(80 尾)健康滇池金线鲃鱼苗均来自中国科学院昆明动物研究所珍稀鱼类保育研究基地。亲本系 2005 年 5~7 月采自滇池流域的嵩明县牧羊河。6 日龄组鱼苗投喂蛋黄浆及黄豆浆, 20 日龄组鱼苗投喂轮虫, 90 日龄鱼苗投喂破碎的 111 鲤鱼饲料(颗粒直径 ≤ 0.5 mm, 通威股份有限公司昆明分公司)(Pan et al, 2009)。

1.2 浸泡溶液配置

实验采用分析纯茜素络合指示剂(上海冠翔生物技术有限公司, 3952-78-1)及茜素红(上海冠翔生物技术有限公司, 130-22-3)。为提高溶解度, 先由蒸馏水配置成为 500 mg/L 的母液, 然后用曝气地下水稀释至所需浓度。

1.3 实验方案

两种化学染料的浸泡液浓度、浸泡时间及样本大小见表 1, 表 2, 各试验组样本数为 10 尾。实验期间将样本置于温度为 16~18 °C 的房间, 浸泡实验开始前 24 h 不投饵, 浸泡结束更换清水后恢复投

饵, 暂养一段时间后用丁香油麻醉致死后摘取耳石并观察。

1.4 耳石摘取及观察

将样本鱼体置于双筒解剖镜下, 以解剖针将耳石取出, 置于玻片上, 清水和酒精清洗及二甲苯透明后, 由透明指甲油封存。由于星耳石在仔鱼出膜后~30 d 出现, 矢耳石在出膜 30 d 后开始呈现狭长生长, 90 d 后在剥取时易破碎, 故两者均不宜作为标记检测载体, 而应以微耳石作为检测对象。光学显微镜和荧光显微镜(选择 510~560 nm 绿色激光作为激发光)观察标记效果(Fu et al, 2005), 且标记效果分为无、可见、清晰及强烈四个等级。

2 结果

2.1 浸泡液安全浓度

茜素红溶液浓度对仔稚鱼的影响结果显示(表 1), 浓度 50~150 mg/L, 浸泡 4~36 h 条件下, 除 50 mg/L, 4 h 实验组中因操作不当造成 1 尾死亡外, 其他各组均存活率均为 100%。当浓度至 200 mg/L 时, 90 日龄稚鱼出现死亡, 24 h 和 36 h 组死亡率分别为 30% ($n=10$) 和 20% ($n=10$)。

茜素络合物溶液浸泡标记结果显示(表 2), 浓度 50~100 mg/L, 浸泡 4~8 h, 6 日龄仔鱼成活率为 100% ($n=10$), 当浓度达到 150 mg/L 时, 仔鱼开始死亡, 浸泡 8 h, 死亡率达 30% ($n=10$)。为实验对象时, 浓度 50~150 mg/L, 浸泡 12~24 h, 对 20 及 90 日龄仔稚鱼的生存没有影响, 且在该浓度下, 浸泡时间延长至 3 d, 鱼苗仍能存活。当浓度 >200 mg/L 时, 90 日龄稚鱼全部死亡。

2.2 标记效果

2.2.1 茜素红浸泡效果

可见光下, 普通光学显微镜观察茜素红溶液浸泡标记的滇池金线鲃耳石, 可见紫红色标记环带, 且标记强度与个体日龄、浸泡浓度及浸泡时间有关。6 日龄仔鱼, 50 mg/L、4 h 实验组可观察到可辨识微弱标记环, 100 及 150 mg/L 试验组均能形成清晰标记环。20 日龄仔鱼, 50 mg/L、12 h 试验组未见标记环, 50 mg/L、2 h 及 100 mg/L, 12 h 实验组仅见微弱标记环, 150 mg/L、24 h 试验组标志环颜色最为强烈(图 A, B)。90 日龄稚鱼, 50 mg/L 未见标志环, 100~200 mg/L 可见标记环。荧光显微镜(绿色激发光)观察, 各实验组均可见猩红色荧

表 1 茜素红溶液浸泡标记方案及标记效果

Table 1 Details of immersion experiments using ARS and their subsequent marking results

日龄 Age (d)	饲养密度 Stocking density (n/L)	浓度 Immersion concentration (mg/L)	浸泡时间 Immersion duration (h)	尾数 Number (n)	全长 Total length (mm)	总死亡率 Total mortality (%)	暂养时间 Rearing days after immersing (d)	效果 Result	
								可见光 Visible light	黄绿激光 Green light
6	50	50	4	10	8.9±0.30	10	5	可见	清晰
			8	10	9.0±0.28	0	5	清晰	强烈
		100	4	10	8.9±0.26	0	5	可见	强烈
			8	10	8.8±0.22	0	5	清晰	强烈
		150	4	10	9.0±0.33	0	5	清晰	强烈
			8	10	8.6±0.26	0	5	强烈	强烈
20	20	50	12	10	11.7±0.23	0	15	无	清晰
			24	10	12.5±0.62	0	15	可见	强烈
		100	12	10	12.3±0.26	0	15	可见	强烈
			24	10	12.1±0.46	0	15	清晰	强烈
		150	12	10	11.9±0.51	0	15	清晰	强烈
			24	10	12.0±0.51	0	15	强烈	强烈
90	5	50	24	10	28.2±4.7	0	27	无	清晰
			36	10	24.6±2.4	0	27	无	清晰
		100	24	10	29.0±3.7	0	27	可见	强烈
			36	10	28.3±5.3	0	27	可见	强烈
		150	24	10	26.4±3.2	0	27	清晰	强烈
			36	10	28.5±4.5	0	27	清晰	强烈
200	24	10	27.1±5.1	30	27	强烈	强烈		
	36	10	27.4±3.4	20	27	强烈	强烈		

表 2 茜素络合物溶液标记方案及标记效果

Table 2 Details of immersion experiments using ALC and their subsequent marking results

日龄 Age (d)	饲养密度 Stocking density (n/L)	浓度 Immersion concentration (mg/L)	浸泡时间 Immersion duration (h)	尾数 Number (n)	全长 Total length (mm)	总死亡率 Total mortality (%)	暂养时间 Rearing days after immersion (d)	效果 Result	
								可见光 Visible light	绿色激光 Green light
6	50	50	4	10	8.9±0.25	0	5	可见	清晰
			8	10	9.0±0.19	0	5	清晰	强烈
		100	4	10	8.9±0.33	0	5	清晰	强烈
			8	10	8.8±0.17	0	5	强烈	强烈
		150	4	10	9.0±0.19	20	5	强烈	强烈
			8	10	8.6±0.19	30	5	强烈	强烈
20	20	50	12	10	11.8±0.29	0	8	可见	清晰
			24	10	11.6±0.68	0	8	清晰	强烈
		100	12	10	12.3±0.52	0	4	清晰	强烈
			24	10	12.5±0.51	0	4	强烈	强烈
		150	12	10	11.6±0.41	0	4	强烈	强烈
			24	10	12.1±0.59	0	4	强烈	强烈
90	5	50	24	10	28.2±4.5	0	26	可见	清晰
			36	10	28.0±5.5	10	26	可见	清晰
		100	24	10	27.6±4.5	0	26	清晰	强烈
			36	10	26.5±4.2	0	26	清晰	强烈
		150	24	10	27.8±5.6	0	26	强烈	强烈
			36	10	27.9±6.5	0	26	强烈	强烈
200	24	10	27.2±4.4	100	—	—	—		

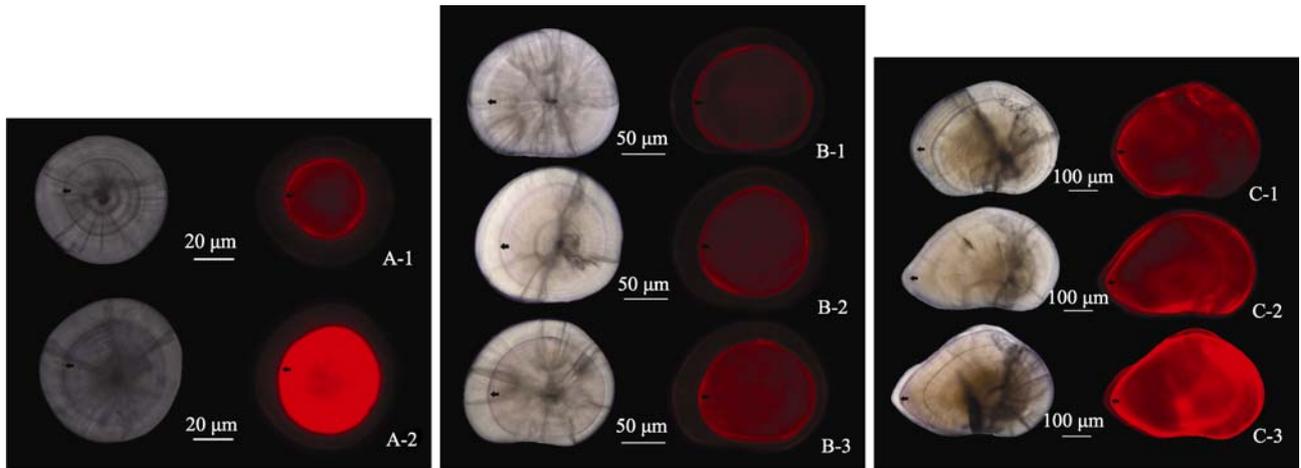


图1 茜素红各类标记方案对仔鱼微耳石的标记效果

Figure 1 Marking results of immersion experiments using ARS

A-1: 50 mg/L 茜素红浸泡 4 h 的 6 日龄仔鱼微耳石; A-2: 100 mg/L 茜素红浸泡 8 h 的 6 日龄仔鱼微耳石; B-1: 50 mg/L 茜素红浸泡 24 h 的 20 日龄仔鱼微耳石; B-2: 100 mg/L 茜素红浸泡 24 h 的 20 日龄仔鱼微耳石; B-3: 150 mg/L 茜素红浸泡 24 h 的 20 日龄仔鱼微耳石; C-1: 100 mg/L 茜素红浸泡 24 h 的 90 日龄稚鱼微耳石; C-2: 150 mg/L 茜素红浸泡 24 h 的 90 日龄稚鱼微耳石; C-3: 200 mg/L 茜素红浸泡 24 h 的 90 日龄稚鱼微耳石; 右侧: 可见光, 左侧: 绿色激光; 黑色箭头: 标记带。

A-1: Lapillus larvae marked with 50 mg/L ARS solution for 4 h when they were 6 days old; A-2: Lapillus larvae marked with 100 mg/L ARS solution for 8 h when they were 6 days old; B-1: Lapillus of larvae marked with 50 mg/L ARS solution for 24 h when they were 20 days old; B-2: Lapillus larvae marked with 100 mg/L ARS solution for 24 h when they were 20 days old; B-3: Lapillus of larvae marked with 150 mg/L ARS solution for 24 h when they were 20 days old; C-1: Lapillus of larvae marked with 100 mg/L ARS solution for 24 h when they were 90 days old; C-2: Lapillus of larvae marked with 150 mg/L ARS solution for 24 h when they were 90 days old; C-3: Lapillus of larvae marked with 200 mg/L ARS solution for 24 h when they were 90 days old; right: visible light; left: green light; black arrow: mark.

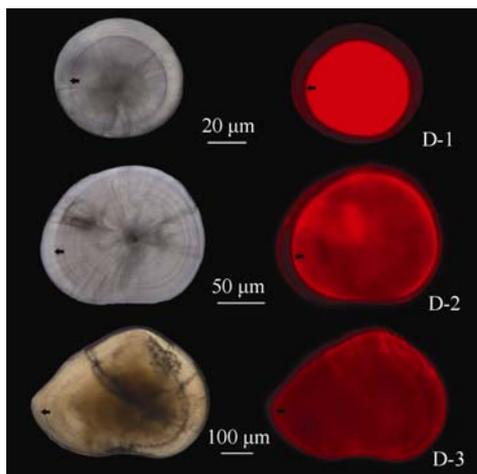


图2 茜素络合物对仔鱼微耳石的标记效果

Figure 2 Marking results of immersion using ALC

D-1: 50 mg/L 茜素络合物浸泡 8 h 标记的 6 日龄仔鱼微耳石; D-2: 100 mg/L 茜素络合物浸泡 24 h 标记的 20 日龄仔鱼微耳石; D-3: 50 mg/L 茜素络合物浸泡 24 h 标记的 20 日龄仔鱼微耳石; 右侧: 可见光; 左侧: 绿色激光; 黑色箭头: 标记带。

D-1: Lapillus of larvae marked with 50 mg/L ALC solution for 8 h when they were 6 days old; D-2: Lapillus of larvae marked with 100 mg/L ALC solution for 24 h when they were 20 days old; D-3: Lapillus of larvae marked with 50 mg/L ALC solution for 24 h when they were 90 days old. right: visible light; left: green light; black arrow: mark.

光反应, 且标记个体日龄越小、浸泡浓度越大及浸泡时间越长, 其颜色越强烈。

2.2.2 茜素络合物浸泡效果

可见光下, 普通光学显微镜观察结果显示, 茜素络合物溶液浸泡标记的仔稚鱼耳石呈现与茜素红相同的紫红色标记环, 且相对于茜素红, 滇池金线鲃仔稚鱼对茜素络合物溶液更加敏感。6 日龄仔鱼, 50 mg/L, 4 h 实验组可见清晰标记环。20 日龄和 90 日龄鱼苗, 50~150 mg/L 实验组均可见紫红色标记环。荧光显微镜下 (510~560 nm 绿色激发光), 各实验组标记带均呈猩红色银光荧光反应。

3 讨论

3.1 检测条件

可见光及绿色激光下均能观察到茜素红和茜素络合物在耳石上所形成的标记环。绿色激光下, 标记环内部区域呈猩红色, 与浸泡标记后生长的耳石部分形成强烈对比, 可见光下, 仅能观察到深红色的标记环; 绿色激光下, 不能观察到耳石的生长轮, 可见光下, 可观察到标记环前后形成的生长轮; 形成可见光下可被观察到的标记环所需的浸泡强

度高于绿色激光。因此, 可见光检测的方法更适用于耳石生长轮生长规律的研究, 而绿色激光检测方法更适用于放流标记。

3.2 浸泡条件及化学染料

浸泡浓度和浸泡时间均可影响标记效果。相同浸泡浓度下, 浸泡时间越长, 效果越好, 同时, 为提高标记效率, 浸泡时间不宜过长。6 日龄仔鱼, 浸泡时间以 8 h 为宜, 20 和 90 日龄鱼苗浸泡时间以 24 h 为宜。在安全浓度范围内, 浸泡液浓度越高, 标记效果越好。为使在可见光下标记效果达到清晰易于辨认的级别, 标记 6 日龄仔鱼时, 茜素红和茜素络合物的浸泡液浓度需达到 50 mg/L; 标记 20 日龄仔鱼时, 两种浸泡液浓度要分别达到 100 mg/L 和 50 mg/L; 标记 90 日龄稚鱼时, 浓度要分别达到 150 mg/L 和 100 mg/L。而在绿色激光下, 50 mg/L 的茜素红和茜素络合物溶液浸泡 6、20 及 90 日龄鱼苗, 便可见清晰标记, 且以上浸泡条件均不影响仔鱼生存。若以放流标记为目的, 50 mg/L 为茜素红和茜素络合物溶液的合适浓度, 而不超过 20 日龄的鱼苗, 还可适当降低浸泡浓度。相同浓度下,

茜素络合物标记效果优于茜素红, 但茜素红更具价格优势, 综合考虑茜素红为标记滇池金线鲃的最佳化学染料。

3.3 标记规格

Secor et al (1991) 认为, 不同鱼龄个体之间标记效果的差异也许和代谢速率有关, 低龄鱼代谢率高于高龄鱼, 更易吸收化学染料并形成标记。滇池金线鲃标记试验中, 个体越小, 越易形成标记环。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。个体越小, 浸泡标记期间的饲养密度就越大, 6 日龄仔鱼饲养密度远高于 90 日龄稚鱼, 大大提高了荧光染料的利用率。因此, 从标记效果、浸泡效率及荧光染料利用率等方面来看, 相较 20 及 90 日龄仔稚鱼, 6 日龄仔鱼更适宜于标记放流。

综上所述, 茜素红和茜素络合物均适用于滇池金线鲃仔稚鱼耳石标记, 但茜素红更具价格优势, 更适用于大规模标记放流。浸泡标记时, 标记环大小取决于浸泡时仔稚鱼耳石的大小, 通过标记不同日龄仔稚鱼来控制标记环的大小, 从而区分不同的放流群体, 是今后的研究重点之一。

参考文献:

- Chen ZM, Yang JX, Su RF, Chen XY. 2001. Present status of the indigenous fishes in Dianchi lake, Yunnan. *Biodiversity Science*, **9**(4): 407-413. [陈自明, 杨君兴, 苏瑞凤, 陈小勇. 2001. 滇池土著鱼类现状. 生物多样性, **9**(4): 407-413.]
- Fu ZD, Li J, Yue BS, Song ZB. 2005. Otolith marking of larval and juvenile Chinese Sucker with fluorescent substances. *Chinese Journal of Zoology*, **40**(4): 60-65. [付自东, 李静, 岳碧松, 宋昭彬. 2005. 用荧光物质浸泡标记胭脂鱼仔、稚鱼耳石. 动物学杂志, **40**(4): 60-65.]
- Jones GP, Milicich MJ, Emslie MJ, Lunow C. 1999. Self-recruitment in a coral reef fish population. *Nature*, **402**(6763): 802-804.
- Jin JB, Wei QW, Sun QL, Li LX, Gan F. 2011. Alizarin marking of otolith at eyed eggs and larvae stages in *Brachymystax lenok tsinlingensis*. *Freshwater Fisheries*, **41**(2): 10-17. [靳建波, 危起伟, 孙庆亮, 李罗新, 甘芳. 2011. 茜素络合物浸泡标记秦岭细鳞鲑发眼卵及仔鱼耳石. 淡水渔业, **41**(2): 10-17.]
- Liu Q, Zhang XM, Zhang PD, Nwafili SA. 2009. The use of alizarin red S and alizarin complexone for immersion marking Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Research*, **98**(1-3): 67-74.
- Pan XF, Yang JX, Li ZY, Chen XY. 2009. Feeding changes and growth performance of *Sinocyclocheilus grahami* (Pisces, Barbiniae) larvae and juveniles in farm environment. *Zoological Research*, **30**(4): 433-437. [潘晓赋, 杨君兴, 李再云, 陈小勇. 2009b. 池塘养殖环境下滇池金线鲃仔稚鱼的食性转化与生长. 动物学研究, **30**(4): 433-437.]
- Secor DH, Miller GW, John MD. 1991. Immersion marking of larval and juvenile hatchery-produced striped bass with oxytetracycline. *Transactions of the American Fisheries Society*, **120**(2): 261-266.
- Tsakamoto K. 1988. Otolith tagging of ayu embryo with fluorescent substances. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **54**(8): 1289-1295.
- van der Walt B, Faragher RA. 2003. Otolith marking of rainbow trout fry by Immersion in low concentrations of Alizarin Complexone. *North American Journal of Fisheries Management*, **23**(1): 141-148.
- Yang JX, Pan XF, Li ZY. 2007. Preliminary report on the successful breeding of the endangered fish *Sinocyclocheilus grahami* endemic to Dianchi lake. *Zoological Research*, **28**(3): 329-331. [杨君兴, 潘晓赋, 李再云. 2007. 云南滇池濒危特有种滇池金线鲃人工繁殖初报. 动物学研究, **28**(3): 329-331.]
- Yue PQ, Chen YY. 1998. China Red Data Book of Endangered Animals: Pisces. Beijing: Science Press, 104-106. [乐佩琦, 陈宜瑜. 1998. 中国濒危动物红皮书(鱼类卷). 北京: 科学出版社, 104-106.]