

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190926002

http://www.yykxjz.cn/

朱亚华, 姜涛, 陈修报, 刘洪波, 杨健. 草鱼仔鱼耳石茜素络合物标记特征研究. 渔业科学进展, 2020, 41(6): 28–36  
Zhu YH, Jiang T, Chen XB, Liu HB, Yang J. The marking characteristics of otoliths of larval grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) by immersion in alizarin complexone. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(6): 28–36

## 草鱼仔鱼耳石茜素络合物标记特征研究\*

朱亚华<sup>1</sup> 姜涛<sup>2</sup> 陈修报<sup>2</sup> 刘洪波<sup>2</sup> 杨健<sup>1,2①</sup>

(1. 南京农业大学无锡渔业学院 无锡 214081; 2. 中国水产科学研究院长江中下游渔业生态环境评价与资源养护重点实验室 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心 无锡 214081)

**摘要** 草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)是我国主要增殖放流经济鱼种之一,探索有效的标志方法对其增殖放流的技术保障和效果评价无疑至关重要。本研究对草鱼仔鱼耳石进行了 1 d 茜素络合物(ALC)荧光标记,以确认该方法的可行性及适宜条件。结果显示,微耳石、矢耳石和星耳石均能被标记。标记环在可见光及荧光下均能被观察到。其中,后者使用蓝色激发光(WBS)观察效果最佳。总体上,微耳石的标记效果最好,矢耳石次之。ALC 浸泡对鱼体的生存及生长无显著影响,耳石上荧光信号出现和消失与鱼体开始浸泡和结束均存在约 12 h 的时滞。浸泡标记过的实验鱼在经过长达 60 d 的恢复续养后,标记环仍清晰可见,表明 ALC 标记效果明显且可长期存在。该方法对草鱼仔鱼的增殖放流标记具有较强的可行性。

**关键词** 草鱼; 仔鱼; 耳石; 茜素络合物; 荧光标记

**中图分类号** Q958 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)06-0028-09

草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)是“四大家鱼”之一,在我国淡水渔业经济中占据着举足轻重的地位。近年来,由于生境破坏、水利设施的修建、过捕等因素,其天然资源急剧下降(沈玉帮等,2011)。为达到渔民增收、资源恢复等目标,国家实施了大规模增殖放流的政策,草鱼属农业部《关于“十三五”水生生物增殖放流工作指导意见》中的主要品种。值得注意的是,一些传统标记方法受到很多限制,如切鳍法只适用于短期标志;挂牌法主要适用于大型鱼类(罗新等,2011);分子标记成本高且检测相对复杂(李树华等,2014)等。因此,探索适合草鱼(特别是鱼苗)增殖放流标记和评价方法刻不容缓。

耳石存在于大多数硬骨鱼类的内耳的膜迷路内,有矢耳石、微耳石和星耳石 3 种类型,对鱼类的听觉

和身体的平衡有重要的作用(Campana, 1999)。耳石标记常用的荧光物质包括盐酸四环素(Tetracycline hydrochloride, TCH)、土霉素(Oxytetracycline, OTC)、钙黄绿素(Celcein, CAL)、茜素红 S(Alizarin red S)和茜素络合物(Alizarin complexone, ALC),其中,ALC 使用最广且效果较好(宋昭彬等,1999;付自东等,2005)。此前,草鱼耳石的研究多集中在形态比较及类群判别(宋昭彬等,2003a、b;曾祥波等,2012)、年龄鉴定及与生长的关系(宋昭彬等,2001b;李建军等,2010)、孵化期推算(管兴华等,2007;张国等,2013)等方面,尚未见有相关化学标记研究。本研究利用 ALC 对草鱼仔鱼的耳石进行标记,探讨此方法对该鱼种的适用性,为今后草鱼相关的大规模标记提供理论依据和技术支撑。

\* 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2019JBFM06)和农业财政专项(CJDC-2017-22)共同资助 [This work was supported by China Central Governmental Research Institutional Basic Special Research Project from Public Welfare Fund (2019JBFM06), and Agricultural Financial Special Support Fund (CJDC-2017-22)]. 朱亚华, E-mail: 756620220@qq.com

① 通讯作者: 杨健, 研究员, E-mail: jiany@ffrc.cn

收稿日期: 2019-09-26, 收修改稿日期: 2019-11-07

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

本实验在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。实验所用的仔鱼苗由基地于 2019 年 5 月 19 日采购(3 日龄)。根据陈真然(1963)的划分标准, 将其归为仔鱼(图 1)。鱼苗采购后, 置于装有经 48 h 曝气自来水的玻璃缸(长×宽×高为 100 cm×45 cm×50 cm)中暂养。暂养过程中投喂蛋黄水, 每日投喂 2 次, 每日清理鱼体排泄物及换水 1 次, 换水量为养殖水体的 1/4。随机选取规格基本一致[平均全长为(8.31±1.21) mm, 平均体重为(0.06±0.02) g]的草鱼仔鱼, 放入桶中作为供试鱼, 于 2019 年 5 月 25 日开始茜素络合物(ALC)标记实验, 标记期间不喂食, 浸泡标记 24 h 后, 移到恢复养殖缸(长×宽×高为 50 cm×50 cm×40 cm)中进行养殖, 在恢复养殖期间, 前期继续投喂蛋黄水, 待草鱼达到 30 日龄后开始投喂粉状普通配合饲料, 每日投喂 2 次, 每日清理鱼体排泄物及换水 1 次, 换水量占养殖水体的 1/4。在暂养及整个实验期间均正常充气增氧, 水温在 23~32℃之间, 自然光照, 不控光周期。

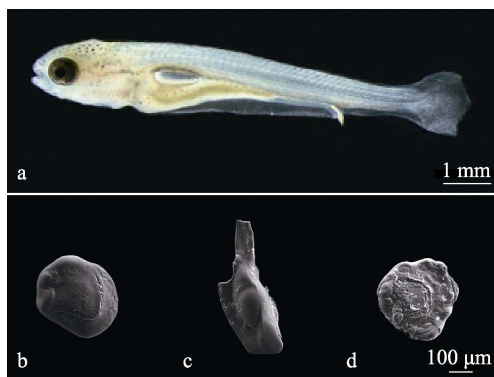


图 1 本研究所用草鱼仔鱼及其 3 类耳石  
Fig.1 The larval *Ctenopharyngodon idellus* and its three types of otoliths

a: 实验鱼; b: 微耳石; c: 矢耳石; d: 星耳石  
a: Experimental fish; b: Lapillus; c: Sagitta; d: Asteriscus

### 1.2 实验方法

本研究的茜素络合物购自生工生物工程(上海)股份有限公司, 包装规格为 1 g/瓶。实验分为 2 个阶段, 第 1 个阶段为浸泡标记阶段。参考邱晨等(2018)的方法, 使用茜素络合物对鲤(*Cyprinus carpio*)仔鱼的浸泡浓度, 实验设置对照组及标记组(100 mg/L), 各组随机选择 100 尾鱼进行 24 h 浸泡实验。浸泡标记期间, 统计 12、24 h 对照组及标记组的个体急性死亡

情况。第 2 个阶段为恢复养殖阶段。浸泡标记结束后, 将标记组实验鱼移出, 放到恢复养殖缸中继续养殖。本研究样本采集分为 2 个阶段, 在恢复养殖的 0~40 d 中, 标记组和对照组每 5 d 定期取样, 每次取样 5 尾, 以设置样本重复。取至第 40 天后, 每 10 d 取样 1 次, 同样每次取样 5 尾, 以确保样本重复, 直至取样到第 60 天结束。取样之后, 利用电子天平测量其体重, 电子游标卡尺测量其全长(数据分别精确至 0.001 g 和 0.01 mm)。0~20 d 的样品先保存在 100%无水乙醇中, 然后置于 4℃的冰箱中冷藏, 25~60 d 的样品直接放入自封袋中, 于-20℃冰箱中冷冻。在恢复养殖期间, 统计标记组和对照组死亡数, 并及时移出死鱼。

### 1.3 耳石样品的摘取、制备及检测方法

将样本鱼置于载玻片上, 放于解剖镜下, 用解剖针将耳石从听囊中快速取出。先用去离子水清洗去除耳石表面的杂质及黏液, 然后用无水乙醇脱水、干燥, 使用电子探针微区分析仪(JXA-8100, 日本电子株式会社)对 3 类耳石形态进行扫描拍照(图 1)。参考邱晨等(2018)对鲤仔鱼荧光标记的处理措施, 使用无色透明指甲油将耳石包埋固定在载玻片上(无需打磨), 待指甲油凝固后, 避光保存(Stöter *et al.*, 2019)。在 OLYMPUS BX51 型显微镜(日本)的可见光、蓝色激发光(WBS)和绿色激发光(WGS)下对其进行观察, 比较最适光源, 并利用显微镜自带的 Stream start 软件进行图谱拍照和图像处理。在进行耳石浸泡标记的时滞观察时, 先将耳石打磨至露出核心, 再在其表面用无色透明指甲油二次固定。使用 OLYMPUS BX51 型显微镜对耳石日轮数目进行计数。耳石标记效果参照欧阳斌等(1999)的方法按无(-)、微弱(+)、较明显(++)、明显(+++)和非常明显(++++) 5 个等级进行记录。

### 1.4 数据分析

利用 Excel 2010 对数据进行统计分析和制图。同时, 利用 SPSS 23.0 软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 对实验鱼生长差异进行显著性分析, 设定差异显著性水平为  $P < 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 ALC 标记对草鱼仔鱼生存及生长的影响

在 24 h 的 ALC 浸泡过程中, 实验组和对照组均未出现死亡, 存活率为 100%。在浸泡过程中, 标记组仔鱼的游泳能力正常, 没有表现出任何异常行为, 说明 100 mg/L 的 ALC 标记对草仔鱼产生的影响较小或者未产生影响。浸泡标记 24 h 后, 移到恢复养殖

缸中继续养殖。在恢复养殖的0~60 d内,统计标记组和对照组的死亡数,截止第60天取样,标记组死亡2尾,对照组死亡9尾,样本数统计不包括死亡数。

随着恢复养殖天数的增加,鱼体发生明显变化,各个器官逐渐发育完全,接近成鱼。观察发现,标记组和对照组在鱼体发育的成熟度上没有明显差异,其摄食和游泳能力均正常。对样本的平均体重及平均全长计算可以看出(图2),草鱼仔鱼的体重及全长随恢复养殖天数增加而逐渐增加。同时,0~10、20~40 d标记组与对照组的平均体重存在显著差异( $P<0.05$ ),15、50、60 d标记组样本鱼的平均体重与对照组差异不显著( $P>0.05$ )。5~10、20~35 d标记组与对照组的平均全长差异显著( $P<0.05$ ),0、15、40~60 d标记组样本鱼的平均全长与对照组差异不显著( $P>0.05$ )。综合来看,标记组和对照组的平均体重及平均全长的差异性呈无规律性。

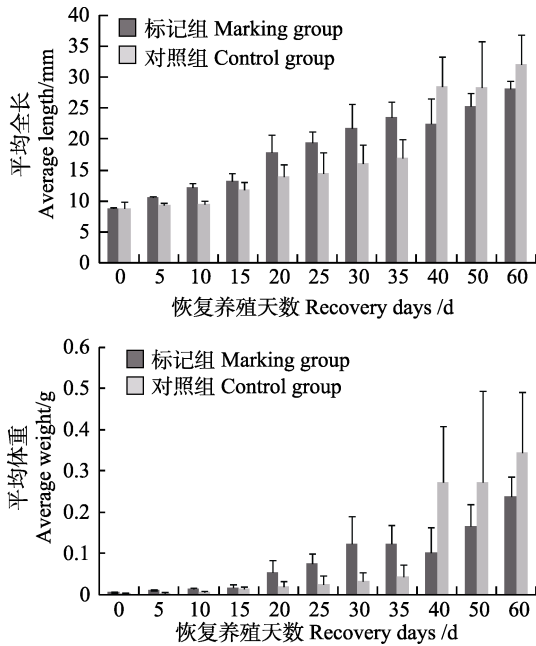


图2 不同取样天数标记组和对照组

草鱼仔鱼的平均体重和平均全长变化( $n=5$ )

Fig.2 Changes of average body weight and average total length of larval *Ctenopharyngodon idellus* of the marking group and control group at different sampling day ( $n=5$ )

## 2.2 茜素络合物浸泡标记草鱼仔鱼耳石效果检测

**2.2.1 草鱼仔鱼3类耳石的ALC浸泡标记效果** 在荧光显微镜的可见光及2种激发光源下观察草鱼仔鱼矢耳石、微耳石和星耳石的标记效果,发现草鱼仔鱼微耳石的标记效果最好,矢耳石次之(图3)。微耳石的形状为椭圆形,经过ALC浸泡标记过的耳石在其上面形成了一个明显的橘红色标记环,且微耳石的

日轮轮纹清晰,在显微镜的可见光下,能清楚地计数日轮数目。同样,矢耳石的标记环也清晰可见,形状为箭矢形,具有中间厚两端薄的特点,随着生长天数的增加,观察到的标记环逐渐模糊。在本实验中,星耳石的荧光标记结果有2种,一种是耳石的标记部分表现为一个小点或一个小环,另一种是观察不到任何标记现象。因此,草仔鱼微耳石的荧光标记效果最佳,是观察草鱼仔鱼标记效果的理想选择。以下内容以微耳石为依据进行比较。

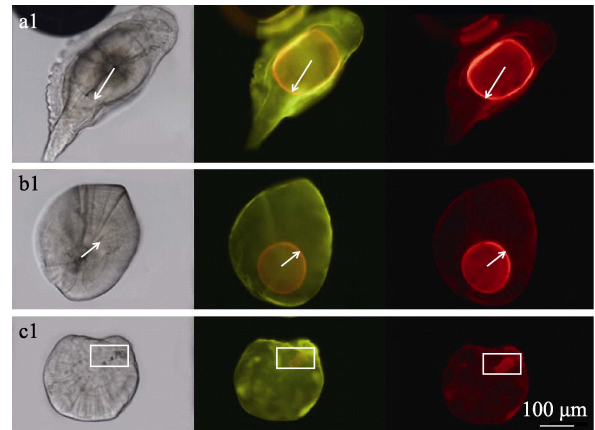


图3 恢复养殖第20天时草鱼仔鱼矢耳石、微耳石和星耳石分别在可见光、蓝色激发光和绿色激发光下的标记效果  
Fig.3 The marking effect of sagitta, lapillus and asteriscus of larval *Ctenopharyngodon idellus* under visible, blue excitation and green excitation lights at the 20th day of recovery culture after ALC immersion

a1: 矢耳石; b1: 微耳石; c1: 星耳石

图中白色箭头由矢耳石、微耳石核心指向荧光标记轮边缘,白色指示框内为星耳石荧光标记环

a1: Sagitta; b1: Lapillus; c1: Asteriscus

The white arrow points from the core of sagitta and lapillus to the edge of the fluorescent marker wheel, and the white indicator box is the fluorescent marker ring of asteriscus

**2.2.2 微耳石经ALC浸泡标记后在3种光源下的信号检测效果** 在可见光、蓝色激发光和绿色激发光下,对微耳石进行拍照观察,发现标记强度明显不同(表1)。所有微耳石在可见光、蓝色激发光和绿色激发光下,均能看到1个明显的标记环,但三者对标记产生的颜色反应不同(图3)。在可见光下,ALC浸泡过后在耳石上看到一个深红色的标记环,但随着恢复养殖天数的增加,深红色标记环的颜色逐渐变淡,甚至完全观察不到。在蓝色激发光下,微耳石上形成一个橘红色的标记环,与没有标记的绿色部分形成强烈反差,颜色鲜艳,容易观察。在绿色激发光下,ALC浸泡过后,耳石上形成一个深红色的标记环,没有被标记部分呈淡橘红色,二者颜色相近,容易造成混淆,

且标记环与未标记部分界线不容易区分,对于识别准确的标记日龄产生一定的干扰。因此,对于草鱼仔鱼荧光标记来说,蓝色激发光为较理想的观察光源。

**2.2.3 不同恢复养殖天数草鱼仔鱼微耳石在蓝色激发光下的 ALC 标记检测效果** 观察不同恢复养殖

天数下的微耳石(图 4)可以看到,荧光标记信号强度呈先增强后减弱的趋势。在第 0 天取样时,即浸泡完成当天取样,就能在耳石上观察到一个明显的标记环,且标记环清晰,说明 ALC 在浸泡当日就在耳石上积累形成了标记。第 5 天时,已能看到耳石标记环

表 1 草鱼仔鱼微耳石在 3 种不同光源下的检测效果  
Tab.1 Detection effect of lapillus of larval *Ctenopharyngodon idellus* under three different light sources

标记日龄 Age of marking(d)	标记时间 Marking duration(h)	恢复天数 Days of recovery culture(d)	取样日龄 Age of samples(d)	标记强度 Marking intensity		
				可见光 Visible light	蓝色激发光 Blue excitation light	绿色激发光 Green excitation light
9	24	0	10	+	++	++
9	24	5	15	++	+++	++
9	24	10	20	++	++++	+++
9	24	15	25	++	++++	+++
9	24	20	30	++	++++	+++
9	24	25	35	++	++++	+++
9	24	30	40	++	++++	+++
9	24	35	45	++	++++	+++
9	24	40	50	+	++++	+++
9	24	50	60	+	+++	++
9	24	60	70	+	+++	++

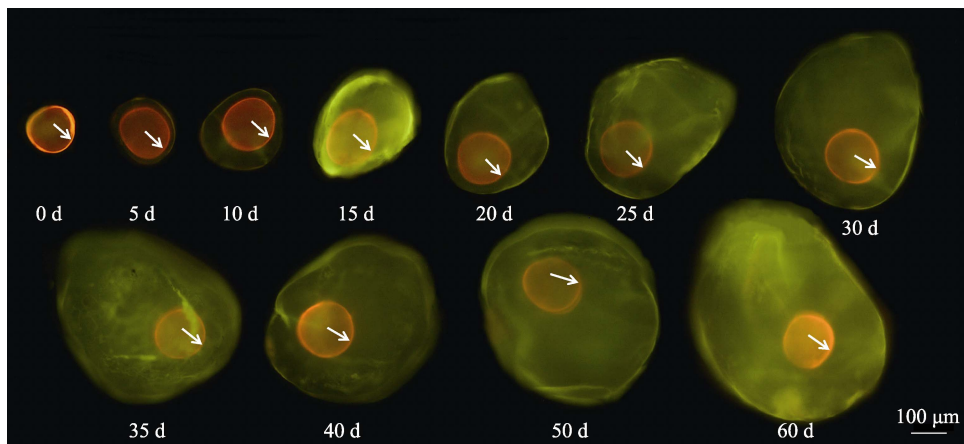


图 4 不同恢复养殖天数下草鱼仔鱼微耳石在蓝色激发光下 ALC 标记效果比较

Fig.4 Comparison of ALC marking effect on lapillus of larval *Ctenopharyngodon idellus* at different day of recovery culture

白色箭头由耳石核心指向荧光标记轮边缘

The white arrow points from the core of otolith to the edge of the fluorescent marker circle

外面的新区域,与标记环里的区域形成强烈反差,标记环观察更为清晰。第 10~40 天的耳石标记环强度基本没有发生变化,荧光信号强度稳定,为最佳观察时间段。但从第 50 天和第 60 天的耳石标记强度来看,荧光信号强度有下降趋势,标记环略模糊,但仍然具有很强的可见性。

**2.3 草鱼仔鱼经 ALC 浸泡后耳石标记出现和消失的时滞**

以浸泡标记第 5 天的微耳石为例(图 5),在显微镜下,3 种可见光下的耳石相同位置上能观察到颜色不同的标记环。在可见光下对耳石的部分进行放大,观察日轮并计算耳石荧光信号标记出现和消失的时

滞。由于草鱼仔鱼的日龄为生长轮数目加 1(宋昭彬等, 2001), 因此, 具有第一日轮的草鱼为 2 日龄, 完整的日轮由明带和暗带共同组成。草鱼仔鱼浸泡当日为 9 日龄, 开始浸泡标记时间为 17:00, 此时, 第 8 日轮的明带已经形成, 暗带开始形成; 而浸泡结束时草鱼仔鱼为 10 日龄, 此时, 第 9 日轮的明带已经形成, 暗带尚未形成。从耳石的荧光标记环来看, 耳石的荧光标记信号在第 9 日轮的明带和暗带上, 在第 9 日轮

前后都无荧光信号出现。即在浸泡当晚, 耳石第 8 日轮暗带形成的过程中, 荧光物质并没有随着碳酸钙进入耳石, 即为浸泡开始与标记出现的时滞, 约 12 h。当浸泡完成后, 第 9 日轮的暗带开始形成, 此时, 仔鱼已经并不处于荧光物质溶液中, 其上面存在的荧光标记信号即为浸泡结束与标记消失的时滞, 约 12 h。因此, 荧光标记环的产生和消失与浸泡的开始和结束均存在约 12 h 的时滞。

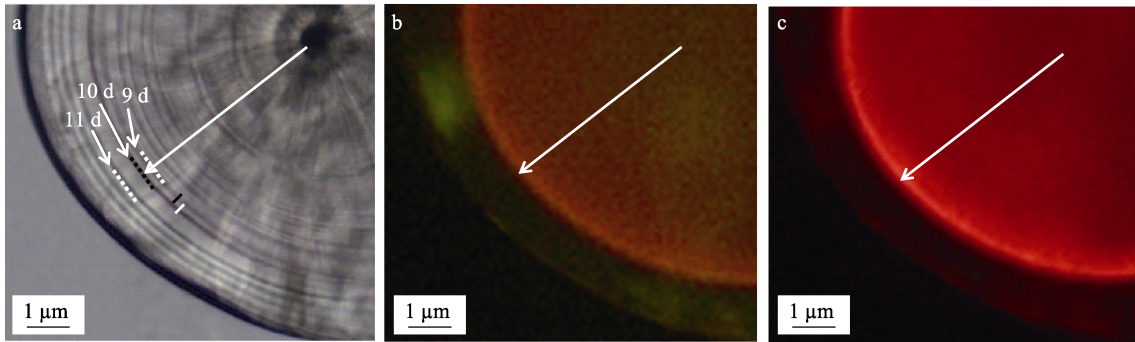


图5 恢复养殖第 5 天时草鱼仔鱼微耳石标记环出现和消失时滞推算

Fig.5 The time lag for the appearance and disappearance of ALC marker ring in the lapillus of larval *Ctenopharyngodon idellus* at the 5 d recovery culture

a、b、c 为恢复养殖 5 d 时微耳石分别在可见光、蓝色激发光、绿色激发光下标记效果图,

a 图中白色箭头由耳石核心指向荧光标记轮边缘; 黑色实线代表浸泡时生长的日轮,

白色实线代表具有荧光标记信号的日轮; 9 d、10 d、11 d 分别表示第 9、10、11 日龄

a, b and c are the mark rings in lapillus under visible light, blue excitation light and green excitation light respectively when the fish had cultured for 5 d after ALC immersion. In the figure a, the white arrow points from the core of otolith to the edge of the fluorescent marker circle. The solid black lines represent the rings that grew during immersion, and the solid white lines represent the rings that had a fluorescent signature; 9 d, 10 d and 11 d represent the 9th, 10th and 11th day of age respectively

### 3 讨论

#### 3.1 草鱼仔鱼 3 对耳石标记差异性特征

曾祥波等(2012)研究发现, 草鱼的矢耳石和微耳石在鱼体孵化时便已存在, 而鱼体的星耳石则在第 12 天出现, 相对较晚, 此现象在各种不同种类鱼体存在(付自东等, 2005; 赵亚鹏等, 2013)。由于 3 对耳石在生长阶段变化的差异性, 先前的研究对象主要集中在微耳石和矢耳石上(宋昭彬等, 2003a、b; 徐永江等, 2016; 付自东等, 2005), 星耳石的研究较少。草鱼仔鱼的矢耳石在刚孵化的时候为圆形, 随着日龄的增加, 逐渐向两端生长, 变成两端薄中间厚的箭矢形; 微耳石最初的形状为圆形, 此外, 还观察到部分微耳石的 2 个核心紧紧相邻, 其日轮清晰, 便于观察, 随着日龄的增加, 耳石逐渐生长为椭圆形。在本研究中, 浸泡当日仔鱼为 9 日龄, 浸泡 24 h 之后为 10 日龄, 故仔鱼的星耳石尚未发育出来, 在观察中看不到荧光物质留下的标记环, 但部分个体的星耳石上又能观察

到一个微弱的橘红色标记环, 说明在浸泡当日有部分个体已经发育出了星耳石, 发育之后星耳石为一豆形, 其核心十分模糊, 不具有一个明显的原基, 但随着日龄的增加, 星耳石逐渐发育完全, 形状逐渐规则, 向圆形过渡, 轮纹清晰。本研究中所有样本鱼理论上处于同一发育日龄, 由于鱼体新陈代谢的差异, 不能完全保证所有鱼体具有完全一致的胚胎孵化周期(Stöter *et al*, 2019), 因此, 不同的鱼苗日龄之间存在偏差, 故能在极个别的样本鱼的星耳石上看到微弱的标记环。还有一种可能是星耳石的发育存在个体差异, 受外界环境的影响, 比如水温、营养、压力等, 部分个体加快了其形成时间。

ALC 标记环能够长期存在于耳石上, 但随着时间的增加, 标记环会逐渐模糊(王正龔等, 2015), 特别是在可见光下看到的深红色标记环(邱晨等, 2019)。何春林等(2008)在对重口裂腹鱼(*Schizothorax davidi*)进行 ALC 标记时, 在可见光下观察到的标记环也较微弱。在本研究 50 d 和 60 d 的样本中, 在可见光下

几乎看不到此标记环,而在蓝色激发光和绿色激发光下依然能够清晰地看到,但没有前期的标记环清晰。这可能是由于恢复养殖时间过长,新的日轮在不断形成,耳石在不断变大,厚度增加而减弱了荧光的穿透性(Iglesias *et al.*, 1997; Noda *et al.*, 2013)。另外,进行浸泡标记时,鱼体年龄很小,标记日轮靠近中心,之前经过标记的日轮与后面长出来的新的日轮形成对比,长出的区域越多,显得标记环越小,也增加了标记检测的难度。司飞等(2019)对牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)进行鳃标记时发现,随着标记部分所占比重的减少,某种程度可能会影响耳石上鳃标记的检出效果。

### 3.2 草鱼仔鱼耳石 ALC 标记环出现和消失的时滞特征

ALC 对多种鱼类均有较好的标记效果(Vigliola, 1997; Skov *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2009; 赵亚鹏等, 2013; Lü *et al.*, 2014)。但关于浸泡开始和结束与荧光标记信号的产生和消失是否存在时间差的研究却很缺乏。邱晨等(2018)通过对鲤仔鱼的观察发现,其荧光标记信号的产生和消失与浸泡开始和结束的时间均有 1 d 的时滞。在本研究中,荧光标记环的产生和消失与浸泡的开始和结束均存在约 12 h 的时滞。这可能与不同种类的鱼具有不同的代谢速率有关。荧光标记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积累越来越多,逐渐形成一个荧光标记环(徐永江等, 2016)。鱼苗的日龄越低,其新陈代谢速率越快,仔鱼的代谢速率要高于稚鱼和成鱼。本研究浸泡当日的鱼苗为 9 日龄,正处于代谢旺盛的时期,对荧光物质具有较好的吸收,荧光物质随着碳酸钙一起沉积在耳石上,形成了肉眼可见的标记环。在进行时滞观察时,由于日轮中还存在部分亚日轮,会影响日轮的正确计数,在进行时滞观察前,需要先将耳石进行打磨,直至暴露出核心为止。姜涛等(2016)在对刀鲚(*Coilia nasus*)耳石几种前处理方法所得年轮的观察中发现,横截面法比矢状面法更有优势。在本研究中,打磨后的耳石矢状面已经能直接清晰地看到日轮,并且无需酸蚀。打磨之后进行抛光,再用无色透明指甲油进行二次包埋,增加耳石的透光性,即可得到较为准确的日轮数目。

### 3.3 草鱼仔鱼耳石 ALC 标记实验条件的特征

对于本研究中的草鱼仔鱼来说,在 100 mg/L 的

ALC 溶液中浸泡标记 24 h,经无色透明指甲油包埋的耳石(无需打磨)可以明显观察到荧光标记,能取得理想的效果。对比可见光 and 不同荧光下不同耳石的标记效果,发现微耳石是检测荧光标记最适宜的耳石类型,且在蓝色荧光下观察效果最佳。邱晨等(2018)对鲤仔鱼的浸泡时间选为 48 h,在本研究中对浸泡时长进行了优化,选择 24 h 作为草鱼仔鱼的浸泡时长,以期能在较短时间下获得理想的荧光标记效果,减少荧光物质浸泡对鱼苗的伤害,节约成本。同时,在经过长达 60 d 的恢复养殖后,仍能取得不错的荧光标记效果。荧光标记一般用来标记仔鱼(Yang *et al.*, 2016),考虑到鱼体生理胁迫的耐受力及鱼体发育的差异性,不同种类、不同规格鱼体的最佳浸泡浓度和浸泡时间也不一样,而浸泡浓度的多少和浸泡时间的长短对标记效果有着决定性的作用(王正鲲鹏等, 2015; 何春林等, 2008; 赵亚鹏等, 2013)。本研究中,由于草鱼仔鱼刚孵化时,星耳石尚未发育(曾祥波等, 2012),即使发育之后星耳石的核心也十分模糊。标记初期如果正好在星耳石产生之时,则标记环相对模糊,但邱晨等(2018)研究表明,星耳石是鲤仔鱼荧光标记的最佳选择,从极个别草鱼仔鱼已经发育出来的星耳石上的标记环也可以看出,一旦星耳石发育形成,ALC 标记同样对星耳石具有很好的适用性,能够在其上形成标记环。如果使用星耳石来观察荧光标记,研究星耳石从何时开始生长且到何时开始长出清晰且有规律的生长是重要环节。在进行荧光标记实验的过程中,不仅仅是区分到仔稚鱼,根据耳石形成的特点具体到某日龄的鱼进行标记能够得到更好的效果。因此,在下一步工作中,作者将进行不同日龄的草鱼在不同浓度茜素络合物和不同浸泡时间下的比较研究,以便确定最适的浸泡规格、浸泡时间及浸泡浓度,同时,标记之后将进行更长期的养殖观察以确定其持久性。

## 4 结论

本研究首次通过 100 mg/L 的茜素络合物对草鱼仔鱼进行 1 d 浸泡实验,获得了理想的标记结果。在可见光、蓝色激发光和绿色激发光下,在 3 种耳石上均能观察到明显的标记环,其中,微耳石的标记效果最好,矢耳石次之;蓝色激发光的检测效果最佳,绿色激发光次之;在可见光下,耳石日轮数目的观察清晰度最高。鱼体浸泡开始和结束的时间与荧光标记环出现和消失的时间均存在约 12 h 的时间差,同时,在长达 60 d 恢复养殖的情况下,仍然能在耳石上检测到明显的标记环。相关结果能够对今后草鱼仔鱼的

增殖放流工作效果的有效评估提供理论参考、技术支持以及条件优化的思路。

## 参 考 文 献

- Campana SE. Chemistry and composition of fish otoliths: Pathways, mechanisms and applications. *Marine Ecology Progress Series*, 1999, 188(1): 263–297
- Chen ZR. Morphological and ecological characteristics of the development of larval and juvenile grass carp. *Chinese Journal of Zoology*, 1963(1): 23–29 [陈真然. 草鱼(鲢)仔、稚鱼期发育的形态生态特征. *动物学杂志*, 1963(1): 23–29]
- Fu ZD, Li J, Yue BS, *et al.* Otolith marking of larval and juvenile Chinese sucker with fluorescent substances. *Chinese Journal of Zoology*, 2005, 40(4): 60–65 [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. *动物学杂志*, 2005, 40(4): 60–65]
- Guan XH, Cao WX. Study on the hatch date and growth of juvenile grass carp from middle reaches of the Yangtze River using daily increment technology. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, 31(1): 18–23 [管兴华, 曹文宣. 利用耳石日轮技术研究长江中游草鱼幼鱼的孵化期及生长. *水生生物学报*, 2007, 31(1): 18–23]
- He CL, Fu ZD, Yan TM, *et al.* Otolith marking of Larval *Schizothorax davidi* with fluorescent substances. *Sichuan Journal of Zoology*, 2008, 27(3): 331–334 [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. *四川动物*, 2008, 27(3): 331–334]
- Iglesias J, Rodríguez-Ojea G. The use of alizarin complexone for immersion marking of the otoliths of embryos and larvae of the turbot, *Scophthalmus maximus* (L.): Dosage and treatment time. *Fisheries Management and Ecology*, 1997, 4(5): 405–417
- Jiang T, Liu HB, Lu MJ, *et al.* The comparison of different pre-treatment methods for acquiring otolith annuli of *Coilia nasus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(2): 62–67 [姜涛, 刘洪波, 卢明杰, 等. 几种前处理方法所获刀鲚(*Coilia nasus*)耳石年轮的效果比较. *渔业科学进展*, 2016, 37(2): 62–67]
- Li JJ, Wu ZQ, Hu ML. Study on otolith and growth in juvenile of the four domestic fishes from Hukou section of the Yangtze River. *Journal of Hydroecology*, 2010, 3(6): 56–61 [李建军, 吴志强, 胡茂林. 长江湖口水域四大家鱼幼鱼的耳石与生长研究. *水生态学杂志*, 2010, 3(6): 56–61]
- Li SH, Chen DQ, Duan XB, *et al.* Genetic effects of released mature *Ctenopharyngodon idellus* on natural populations based on the mitochondrial DNA markers in the middle reaches of the Yangtze River. *Freshwater Fisheries*, 2014, 44(3): 45–50 [李树华, 陈大庆, 段辛斌, 等. 基于线粒体DNA标记的长江中游草鱼亲本增殖放流的遗传效果评估. *淡水渔业*, 2014, 44(3): 45–50]
- Liu Q, Zhang XM, Zhang PD, *et al.* The use of alizarin red S and alizarin complexone for immersion marking Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* (T.). *Fisheries Research*, 2009, 98(1): 67–74
- Lü HJ, Zhang XM, FM, *et al.* Use of tetracycline hydrochloride and alizarin complexone for immersion marking black rockfish *Sebastes schlegelii*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2014, 32(4): 810–820
- Luo X, Zhang QZ, Cui M. Tagging techniques applied to *Ctenopharyngodon idellus*. *Journal of Hydroecology*, 2011, 32(6): 135–140 [罗新, 张其中, 崔森. 草鱼标志技术的初步研究. *水生态学杂志*, 2011, 32(6): 135–140]
- Noda T, Nagakura Y, Ohta K, *et al.* Validation of transgenerational otolith marking using alizarin complexone for embryos in black rockfish *Sebastes schlegelii* ovaries. *Aquaculture*, 2013, 61(2): 207–209
- Ouyang B, Chang JB. Using fluorescent substance to mark larvae and juvenile of *Gobiocypris rarus* and *Carassius auratus pengze* Var. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1999, 23(4): 324–329 [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. *水生生物学报*, 1999, 23(4): 324–329]
- Qiu C, Jiang T, Chen XB, *et al.* Effect of alizarin complexone marking for otolith of juvenile crucian carp *Carassius auratus*. *Chinese Journal of Zoology*, 2019, 54(5): 678–686 [邱晨, 姜涛, 陈修报, 等. 鲫幼鱼耳石荧光标记效果. *动物学杂志*, 2019, 54(5): 678–686]
- Qiu C, Jiang T, Chen XB, *et al.* Study on otolith marking of larval common carp *Cyprinus carpio* by immersion in alizarin complexone. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(11): 1754–1765 [邱晨, 姜涛, 陈修报, 等. 茜素络合物对鲤仔鱼耳石标记特征研究. *水产学报*, 2018, 42(11): 1754–1765]
- Shen YB, Zhang JB, Li JL. Advances in studies on genetic resources of grass carp. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2011, 27(7): 369–373 [沈玉帮, 张俊彬, 李家乐. 草鱼种质资源研究进展. *中国农学通报*, 2011, 27(7): 369–373]
- Si F, Wang QL, Yu QH, *et al.* Use of strontium chloride in otolith marking of Japanese flounder. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(4): 65–72 [司飞, 王青林, 于清海, 等. 基于投喂法的牙鲆耳石锶标记. *渔业科学进展*, 2019, 40(4): 65–72]
- Skov C, Grnkjr P, Nielsen C. Marking pike fry otoliths with alizarin complexone and strontium: An evaluation of methods. *Journal of Fish Biology*, 2001, 59(3): 745–750
- Song ZB, Cao WX. Dimensions of otolith primordia and nuclei in larval grass carp and silver carp. *Journal of Sichuan University (Natural Science)*, 2003a, 40(4): 774–777 [宋昭彬, 曹文宣. 草鱼和鲢仔鱼耳石原基和中心核特征的研究. *四川大学学报(自然科学版)*, 2003a, 40(4): 774–777]
- Song ZB, Cao WX. Otolith marking and daily increment

- validating in larval and juvenile yellowcheek carp, *Elopichthys bambusa*. Acta Hydrobiologica Sinica, 1999, 23(6): 677–682 [宋昭彬, 曹文宣. 鳊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]
- Song ZB, Cao WX. Study on the growth of juvenile grass carps in Yangtze River. Freshwater Fisheries, 2001a, 31(5): 45–48 [宋昭彬, 曹文宣. 长江草鱼幼鱼的生长研究. 淡水渔业, 2001a, 31(5): 45–48]
- Song ZB, Chang JB, Cao WX, et al. Otolith microstructure of hatchery-reared and wild juveniles of grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*. Acta Hydrobiologica Sinica, 2003b, 27(1): 7–12 [宋昭彬, 常剑波, 曹文宣, 等. 人工饲养和野生草鱼幼鱼耳石微结构的比较研究. 水生生物学报, 2003b, 27(1): 7–12]
- Song ZB, Chang JB, Cao WX. Daily age and growth of larval grass carp from the middle reaches of the Yangtze River. Journal of Fisheries of China, 2001b, 25(6): 500–506 [宋昭彬, 常剑波, 曹文宣. 长江中游草鱼仔鱼的日龄和生长研究. 水产学报, 2001b, 25(6): 500–506]
- Stöter S, Degen-Smyrek AK, Krumme U, et al. Marking otoliths of Baltic cod (*Gadus morhua* Linnaeus, 1758) with tetracycline and strontium chloride. Journal of Applied Ichthyology, 2019, 35(2): 427–435
- Vigliola L. Validation of daily increment formation in otoliths for three *Diplodus* species in the Mediterranean Sea. Journal of Fish Biology, 1997, 51(2): 349–360
- Wang ZK, Zhao T, Lin XT, et al. Effects of alizarin complexone (ALC) on otolith marking, growth, and survival of *Tanichthys albonubes*. Chinese Journal of Ecology, 2015, 34(1): 189–194 [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]
- Xu YJ, Liu XZ, Shi B, et al. Alizarin complexone marking of otoliths of juvenile *Cynoglossus semilaevis*. Progress in Fishery Sciences, 2016, 37(6): 11–18 [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. 渔业科学进展, 2016, 37(6): 11–18]
- Yang K, Zeng RK, Gan WX, et al. Otolith fluorescent and thermal marking of elongate loach (*Leptobotia elongata*) at early life stages. Environmental Biology of Fishes, 2016, 99(8–9): 687–695
- Zeng XB, Zhang GH. Species identification at the larval and juvenile stages for several Chinese domestic fishes by elliptical Fourier analysis of otolith form. Journal of Fishery Sciences of China, 2012, 19(6): 970–977 [曾祥波, 张国华. 基于傅立叶耳石形态分析法对几种家鱼仔稚鱼的种类判别分析. 中国水产科学, 2012, 19(6): 970–977]
- Zhang G, Wu L, Duan M, et al. Hatch dates and early growth for juveniles of the four major carps from different sections of the middle Yangtze River. Acta Hydrobiologica Sinica, 2013, 37(2): 306–313 [张国, 吴朗, 段明, 等. 长江中游不同江段四大家鱼幼鱼孵化日期和早期生长的比较研究. 水生生物学报, 2013, 37(2): 306–313]
- Zhao YP, Pan XF, Yang JX, et al. Use of alizarin red S and alizarin complexone for immersion marking *Sinocyclocheilus grahami*. Zoological Research, 2013, 34(5): 499–503 [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]

(编辑 冯小花)



## The Marking Characteristics of Otoliths of Larval Grass Carp (*Ctenopharyngodon idellus*) by Immersion in Alizarin Complexone

ZHU Yahua<sup>1</sup>, JIANG Tao<sup>2</sup>, CHEN Xiubao<sup>2</sup>, LIU Hongbo<sup>2</sup>, YANG Jian<sup>1,2</sup>①

(1. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081; 2. Key Laboratory of Fishery Ecological Environment Assessment and Research Conservation in Middle and Lower Reaches of the Yangtze River, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081)

**Abstract** The grass carp *Ctenopharyngodon idellus* is one of the main economic fish species for release and resource enhancement in China. In this study, the otoliths of larval grass carps were marked for 1 d by alizarin complexone (ALC) to confirm the feasibility and appropriate conditions for the method. The results showed that lapillus, sagitta, and asteriscus could be successfully marked. The marking rings were observed under both visible light and fluorescence, the latter of which was most obviously observed using blue excitation light. Overall, lapillus had the best marking effect, followed by sagitta. ALC immersion had no significant effect on fish survival and growth. The appearance and disappearance of fluorescent signals on the otolith, the beginning and end of immersion of the fish had a time lag of about 12 h. At 60 d of recovery of the culture after immersion, the ALC mark ring was still visible, indicating that the ALC-marked effect was evident and could exist for quite a long time. This method has a strong feasibility for marking and effect assessment of the larval grass carp for future resource enhancement and release.

**Key words** Grass carp *Ctenopharyngodon idellus*; Larvae; Otolith; Alizarin complexone; Fluorescent marking

① Corresponding author: YANG Jian, E-mail: jiany@ffrc.cn