

三疣梭子蟹的两种标记技术

高保全^{1,2} 刘 萍^{1*} 李 健¹ 王清印^{1,2}

(¹ 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(² 中国海洋大学海洋生命学院, 青岛 2660031)

摘 要 本研究采用注射可视嵌入性荧光、剪附肢两种手段对不同期别的三疣梭子蟹进行标记, 以研究标记的适用性及对个体生长的影响。对不同发育阶段三疣梭子蟹进行两个部位荧光注射, 统计蜕壳后可识别率。结果显示, II、III 期幼蟹适合腹面区域注射, IV 期以后幼蟹适合游泳足基节和头胸甲背面的薄膜关节注射; 标记后, 经过两次蜕壳, 识别率在 80% 以上, 但经 3 次蜕壳后, 识别率较低; 根据标记组、未标记组生长数据, 通过单因素方差分析发现, 标记对三疣梭子蟹个体生长无显著性影响。VII 期以后的幼蟹, 更适合剪附肢法, 该法操作简单、识别率高, 对个体生长、存活无显著性影响 ($P > 0.05$)。

关键词 三疣梭子蟹 可视嵌入性荧光标记 剪附肢

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2013)06-0087-07

Two types of tagging techniques for *Portunus trituberculatus*

GAO Bao-quan^{1,2} LIU Ping^{1*} LI Jian¹ WANG Qing-yin^{1,2}

(¹ Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(² College of Life Science and Technology, Ocean University of China, Qingdao 266003)

ABSTRACT The suitability of visible implant fluorescent elastomer (VIE) and shear appendage for tagging *Portunus trituberculatus* was investigated. VIE was implanted into two body positions of *P. trituberculatus* at different stage. Feasibility was evaluated based on tag retention, the impact of tagging site on growth and survival, and juvenile size. We found that VIE injection in the ventral region is suitable for Stage II and III juvenile crabs. The joint of swimming leg coxa and carapace are suitable for Stage IV and later stage juvenile crabs. Tag retention rate was more than 80% for crabs that molted twice, but it was lower for crabs that molted three times. The growth and survival rates were compared with those of an equal number of untagged crabs. The results showed that tags had no impact on the growth or survival of juvenile crabs. Due to the higher tag retention rate and simplicity of operation, shear appendage tagging is recommended for Stage VII juvenile crabs and the older. The two tagging techniques can be used for select-breeding and enhancement of crab.

国家高技术研究发展计划项目(2012AA10A409)和中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(20603022012015)共同资助

* 通讯作者。E-mail: liuping@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2012-12-06; 接受日期: 2012-12-21

作者简介: 高保全(1980-), 男, 助理研究员, 主要从事海水养殖生物种质资源与遗传多样性研究。E-mail: gaobq@ysfri.ac.cn,

Tel: (0532)85823291-807

KEY WORDS *Portunus trituberculatus* Visible implant fluorescent elastomer (VIE)
Shear appendage

标记技术是根据物体所具有或被具有的特性来认识物体的一种鉴别科学,包括物理标记、生物标记、化学标记。其中物理标记指用物理的方法对所研究的生物个体或群体进行跟踪、警示或鉴别(龙华等 2006)。在水生动物的物理标记研究中,多是关于增殖放流效果评估、生物洄游路线调查等。薄治礼等(2002)使用体外挂标志牌和体内注射色液方法对赤点石斑鱼 *Epinephelus akaara* 和青石斑鱼 *Epinephelus awoara* 幼鱼(人工培育幼鱼和野生幼鱼)和野生成鱼进行标志放流试验,结果表明,石斑鱼幼鱼和成鱼移动范围不大,幼鱼最长经 651 d、成鱼最长经 48 d 的移动均在 2 n mile 以内。杨德国等(2005)用外挂银牌和 CWT 双重标记,向长江放流人工繁殖中华鲟,结果表明,人工放流中华鲟稚鲟和幼鲟的生长、洄游及分布与自然种群没有明显差异,放流较大规格的幼鲟有利于提高其成活率。Esben 等(2001)对褐鳟幼体进行了荧光标记实验,并研究了荧光标记对幼体生长和存活率的影响。郝振林等(2008)利用荧光物质-茜素络合指示剂浸泡金乌贼幼体,对其内壳进行标志,结果显示,此标志法不影响金乌贼成活率及生长发育。董智勇等(2010)在曼氏无针乌贼幼体背部注射茜素络合指示剂溶液,结果显示,此方法对曼氏无针乌贼成活率和生长发育均无显著影响,比较适用。

在甲壳动物中,罗坤等(2008)采用可视嵌入性荧光标记对中国对虾幼虾进行标记。结果显示,此标记对中国对虾的生长没有影响,标记保持率很高,适合中国对虾大规模标记。刘海映等(2009)对中国对虾和日本对虾进行荧光标记实验,标记保持率在 95% 以上。Jerry 等(2001)对小龙虾进行步足、腹部和尾肢 3 个部位的标记,70 d 后的标记保持率分别为 94%、92% 和 82%。Godin 等(1995)进行过凡纳滨对虾 *Penaeus vannamei* 的幼体和成虾荧光标记实验,标记的部位为第 6 腹节,70~98 d 后,幼体和成虾的标记保持率分别为 99.9% 和 100%。Fitz 等(1991)进行美洲蓝趾蟹 *Callinectes sapidus* 室内芯片标记实验,第 1 次蜕皮后,标记识别率为 96%~98%,且成活率、生长速度与未标记组无显著性差异;Okamoto 等(1999)进行了三疣梭子蟹 *Portunus trituberculatus* 金属丝编码标记实验,幼蟹标记后进行养殖,20d 后 70% 可以识别,19~120 d 后,10% 可识别。

目前,三疣梭子蟹养殖业主要还是依靠捕捞野生亲蟹来满足生产育苗的需要,这种状态限制了其发展。一方面,这些捕捞的野生三疣梭子蟹可能携带感染性病毒。据报道,近年来,随着梭子蟹养殖规模的不断扩大,各种病害也开始接踵而至,并出现大规模发生和暴发性流行的趋势,给产业和区域经济的发展造成重大损失(王国良等 2006);另一方面,由于环境恶化和过度捕捞导致野生资源下降。为了改善这种状况以及实现三疣梭子蟹产业的可持续性发展,目前我国科技工作者展开了两方面的研究:增殖放流与良种培育。我国每年三疣梭子蟹增殖放流量达数亿尾,由于没有合适的个体标记,无法对放流个体进行跟踪或回捕率调查等。再者三疣梭子蟹选育工作已展开,为精确评估各家系生长性能、各个重要经济性状的遗传参数,需要将幼体放入同一环境条件下进行培育,以消除环境差异对遗传方差的影响,而使幼体在同一环境条件下混养就需要对个体或品系进行标记。针对以上问题,结合三疣梭子蟹生物特性,本研究采用荧光标记和剪附肢两种方法对三疣梭子蟹进行标记,完成梭子蟹整个养殖过程的标记,对三疣梭子蟹的育种、增殖放流效果评估工作具有重要意义。

1 材料与方 法

1.1 材 料

本研究在山东省昌邑市海丰水产养殖有限责任公司进行,用于实验的三疣梭子蟹来源于该公司 2010 年 4 月培育的家系,荧光标记材料(VIE)购自美国 NMT 公司。

1.2 方 法

1.2.1 荧光标记方法

将进行荧光标记的两种成分按比例混合均匀。一种成分为荧光颜料,另一种为凝固剂,按 1:1 的比例进行混合。将混合物吸取适量到 3 ml 的小型注射器中,使用 29 号针头,用专门的手动注射器进行注射。注射部

位为 A、B 两个部位,其中 A 为三疣梭子蟹第二、三、四对附肢所对应的结构相似的腹面区域,B 为游泳足基节和头胸甲背面的薄膜关节(图 1)。在标记前先用酒精对注射部位进行消毒,注射完毕后,再次用酒精进行消毒以免感染。本研究中荧光标记在最佳注射部位研究中,每期 A、B 两个部位各注射 100 个个体,通过比较效果,制定不同发育阶段(从 II 期幼蟹开始)最佳注射部位;在荧光标记识别率分析研究中,每期各注射 100 个个体,每次蜕壳后统计可识别个数,计算识别率;而在荧光标记对生长影响研究中,以 5 个家系 VIII 期个体为材料做标记,每个家系 4 个平行,每个平行 25 个个体,同时建立未做标记对照组 4 个平行,每个平行 25 个个体,测量每个个体初始体重及养殖 20、40 d 后体重。

1.2.2 剪附肢

利用手术剪对三疣梭子蟹游泳足末节进行两种方式剪切:直线型、三角型。用酒精棉球对手术剪和剪切部位进行消毒。本研究中在剪附肢标记识别率分析研究中,每种剪切方式各剪切 100 个个体,每次蜕壳后统计可识别个数,计算识别率;而在剪附肢标记对生长影响研究中,以 5 个家系 VIII 期个体为材料做标记,每个家系 4 个平行,每个平行 25 个个体,同时建立未做标记对照组 4 个平行,每个平行 25 个个体,测量每个个体初始体重及养殖 20、40d 后体重。

1.2.3 养殖

完成标记后的个体放入 10m³ 水泥池中养殖,连续充气,饵料以大卤虫、鲜活蓝蛤为主;同样条件下设立未标记三疣梭子蟹对照组。蜕壳后,进行标记保持率统计、生长性状指标测量。

1.3 统计分析

采用 SPSS 软件分析标记三疣梭子蟹和未标记三疣梭子蟹的体重差异情况,并对标记的保持率进行统计。

2 结果

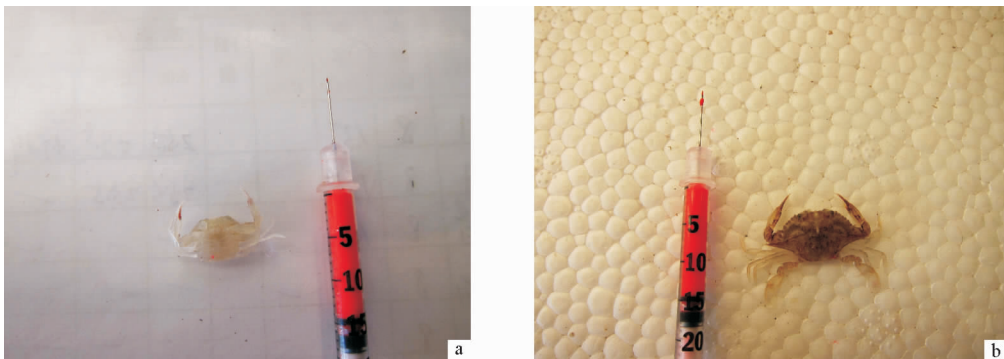
2.1 各期幼蟹最佳注射部位

根据三疣梭子蟹个体规格及甲壳不透明两个因素,制定了每个发育期(II 期幼蟹至 X 期成蟹,三疣梭子蟹每蜕壳 1 次,发育期增加 1)最佳荧光注射部位,见表 1。图 1 为不同部位荧光标记示意图。

表 1 三疣梭子蟹各发育期最佳注射部位

Table 1 Best injection site for *Portunus trituberculatus* at different stage

发育阶段	Development stage	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
全甲宽	Full carapace width(mm)	7.0	13.3	19.4	24.5	36.8	55.0	75.0	95.0	123.0
标记部位	Tagged site	A	A	B	B	B	B	B	B	B



a. III 期幼蟹在 A 部位注射荧光

b. IV 期幼蟹在 A 部位注射荧光

a. VIE injection of Stage III juvenile crab at site A

b. VIE injection Stage IV juvenile crab at site A

图 1 不同部位荧光标记

Fig. 1 The diagram of different injection site

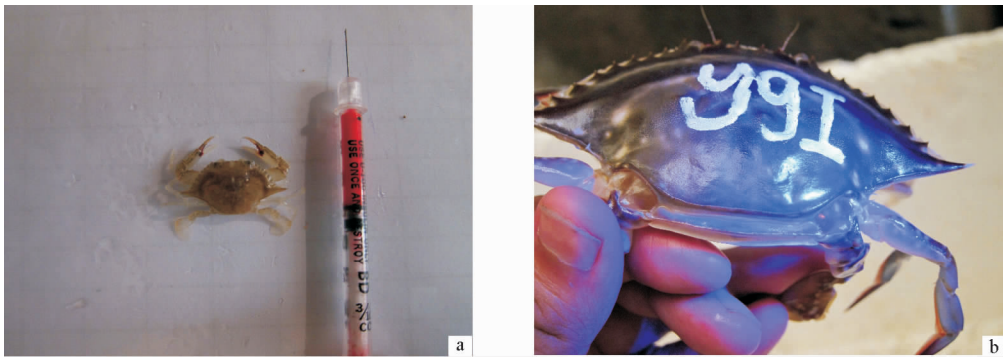
2.2 荧光标记识别率

各期幼蟹在最佳部位注射荧光标记,蜕皮后荧光标记识别率结果见表2。横轴为做标记的期别,纵轴为标记后发育期别。由表2得知荧光标记后,第一次蜕壳可识别率为100%。图2为蜕壳后荧光标记效果图。V期幼蟹经过3次蜕壳后,发育至Ⅷ期时,部分个体荧光标记清晰可辨。

表2 三疣梭子蟹荧光标记蜕壳后识别情况

Table 2 The recognition rate of VIE through multiple molts

发育阶段 Development stage	识别率 Recognition rate(%)							
	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
III	100							
IV	98	100						
V	80	96	100					
VI	10	35	96	100				
VII	0	20	30	90	100			
VIII		0	12	22	89	100		
IX			0	0	15	80	100	
X					0	10	80	100



a. V期幼蟹在B部位注射荧光标记
a. VIE injection of Stage V juvenile crab at site A

b. V期幼蟹经过3次蜕壳后
b. VIE effect of Stage V juvenile crab after three molts

图2 蜕壳后荧光标记效果

Fig. 2 The effects of VIE after molts

2.3 荧光标记对梭子蟹生长的影响

对2010年5个家系Ⅷ期幼蟹注射荧光标记,标记时的体重与标记后养殖20d、40d的体重进行单因素方差分析。结果显示,荧光标记梭子蟹与未标记梭子蟹在初始体重、20d、40d后体重均无显著差异($P > 0.05$) (表3)。

表3 荧光标记对个体生长及存活的影响

Table 3 Effect of VIE on growth and survival of *P. trituberculatus*

家系 Family	初始体重 Initial body weight(g)		20d后体重 Body weight at 20d(g)		40d后体重 Body weight at 40d(g)		40d后成活率 Survival rate at 40d(%)	
	标记组 Tagged	对照组 Control	标记组 Tagged	对照组 Control	标记组 Tagged	对照组 Control	标记组 Tagged	对照组 Control
	1	29.83±4.23	29.88±4.12	77.04±9.21	78.21±9.29	119.45±14.04	120.45±14.21	48.00±7.35
2	30.73±4.51	30.53±4.38	80.18±10.21	79.40±10.23	121.82±14.21	118.27±13.18	46.00±7.24	52.00±8.36
3	32.81±4.42	32.72±4.25	78.54±9.25	78.94±9.24	113.41±11.48	117.52±12.75	52.00±8.42	48.00±7.52
4	32.90±4.18	32.93±4.25	77.73±9.18	77.27±9.07	118.25±12.89	116.98±12.38	56.00±8.96	60.00±9.25
5	32.10±4.22	32.15±4.24	83.40±10.84	83.48±10.88	120.33±14.29	125.39±14.87	62.00±9.46	60.00±9.30

对 5 个家系标记组、对照组成活率进行单因素方差分析,结果显示,荧光标记梭子蟹与未标记梭子蟹在 40d 后成活率均无显著差异($P < 0.05$)。

2.4 剪附肢标记识别率

由于 II ~ VI 期幼蟹个体太小,不太适合剪附肢,因此剪附肢标记适合于 VII 期以后的幼蟹。剪附肢方式包括直线型、三角型。蜕皮后标记识别率见表 4,识别率均为 100%。

图 3 为剪附肢标记示意图。图 4 为蜕壳前后剪附肢效果图。

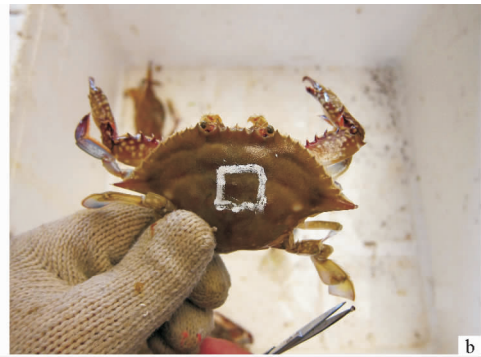
表 4 剪附肢标记识别情况

Table 4 The recognition rate of shear appendage through multiple molts

发育阶段 Development stage	识别率 Recognition rate(%)		
	VII	VIII	IX
VIII	100		
IX	100	100	
X	100	100	100



a. 采用三角型剪附肢标记 VIII 期个体
a. Trigonal shear appendage of Stage VIII crab



b. 采用直线型剪附肢标记 VIII 期个体
b. Rectilinear shear appendage of Stage VIII crab

图 3 剪附肢标记

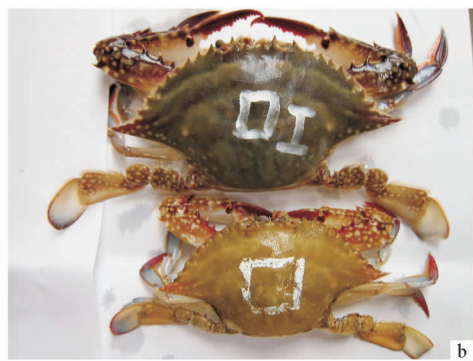
Fig. 3 The diagram of different shear appendage

2.5 剪附肢对梭子蟹生长的影响

对 2010 年 5 个家系个体标记 VIII 期幼蟹的体重与 20d、40d 后的体重进行单因素方差分析。结果显示,剪附肢梭子蟹与未标记梭子蟹在初始体重、20d、40d 后体重均无显著差异($P < 0.05$)(表 5)。



a. 三角型剪附肢个体蜕壳前后标记的变化
a. The tag in pre-molt and post-molt of trigonal shear appendage crab



b. 直线型剪附肢个体蜕壳前后标记的变化
b. The tag in pre-molt and post-molt of rectilinear shear appendage crab

图 4 蜕壳前后剪附肢标记效果

Fig. 4 The effects of shear appendage after molts

表5 剪附肢标记对三疣梭子蟹个体生长及存活的影响

Table 5 Effect of shear appendage on growth and survival of *P. trituberculatus*

家系 Family	初始体重 Initial body weight(g)		20d 后体重 Body weight at 20d(g)		40d 后体重 Body weight at 40d(g)		40d 后成活率 Survival rate at 40d(%)	
	标记组 Tagged	对照组 Control	标记组 Tagged	对照组 Control	标记组 Tagged	对照组 Control	标记组 Tagged	对照组 Control
	1	29.12±4.21	29.49±4.32	73.28±9.36	72.34±9.18	122.35±14.33	121.21±14.12	52.00±8.60
2	32.63±4.62	31.43±4.52	82.38±9.72	79.78±9.85	124.31±14.26	119.37±14.54	48.00±7.21	50.00±8.42
3	31.81±4.38	32.88±4.65	76.34±9.97	74.49±9.45	114.81±13.89	116.32±14.13	52.00±7.98	48.00±7.35
4	32.94±4.71	32.27±4.20	74.39±9.54	76.42±9.88	117.95±14.23	118.42±14.08	60.00±8.94	58.00±8.89
5	30.14±4.39	31.45±4.33	84.56±10.15	82.39±10.23	121.42±14.08	123.69±14.62	62.00±9.05	60.00±9.96

对5个家系标记组、对照组成活率进行单因素方差分析,结果显示,剪附肢标记梭子蟹与未标记梭子蟹在40d后成活率均无显著差异($P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 两种标记对三疣梭子蟹存活和生长的影响

通过对三疣梭子蟹标记后成活率、体重的统计分析,发现荧光标记、剪附肢标记的梭子蟹和未标记的梭子蟹在成活率、生长方面无显著差异,表明梭子蟹的生长没有受到标记的影响。

三疣梭子蟹体内标志实验,如锚状金属牌(林元华等 1985)、金属丝编码(Okamoto *et al.* 1999),均不适合三疣梭子蟹增殖放流与良种选育:第一,规格小;三疣梭子蟹自Ⅱ期幼蟹开始室外放流或养殖,而Ⅱ期幼蟹全甲宽大约0.7cm,规格小不适合体内标志注射;第二,伤害大:用机械枪体内注射时,易发生破壳及体液流出,这些损害均易导致个体死亡;第三,价格昂贵:三疣梭子蟹增殖放流、良种选育工作每年均需要标记个体达几十万只,体内标志相对来说,价格较高。

3.2 标记的保持率分析

从统计结果可以看出,梭子蟹标记Ⅱ~Ⅳ期最佳标记为腹面区域注射荧光标记;Ⅴ~Ⅵ期最佳标记为游泳足基节和头胸甲背面的薄膜关节注射荧光标记;Ⅶ~Ⅷ期最佳标记为剪附肢。荧光标记经两次蜕壳后,可识别率在80%以上,但经3次蜕壳后,识别率很低。因此在应用过程中,如果养殖期间超过两次蜕壳,中间需要再注射荧光。剪附肢易操作,但要求个体规格大,规格太小,不易识别。因此,将两种标记结合起来利用,效果最佳。

3.3 两种标记在三疣梭子蟹研究领域的应用前景

我国从20世纪50年代开始渔业资源增殖研究与放流活动,科研工作者围绕增殖效果和回捕率进行了大量研究探索,并以标志技术的研究、标志生物的采集和渔获物产量统计等方法作为评估增殖放流效果的重要手段。自2000年以来,三疣梭子蟹增殖放流工作逐渐展开,增殖效果急需科学评价,标记问题的初步解决必将为增殖放流效果的评价起到积极推动作用。

在三疣梭子蟹大规模家系选育过程中,由于混养时采取的标记手段必须要能够区分开足够数量的家系,而荧光标记技术用不同部位、不同颜色组合,则可完全解决这个问题。标记的解决,首先可以精确评估三疣梭子蟹重要经济性状遗传参数,其次可以对三疣梭子蟹个体育种值进行评估。因此,梭子蟹个体标记的解决必将加快三疣梭子蟹良种培育的进程。

参 考 文 献

- 王国良,金 珊,李 政,陈寅儿. 2006. 三疣梭子蟹(*P. trituberculatus*)乳化病的组织病理和超微病理研究. 海洋与湖沼,37(4): 297-303
- 龙 华,郑 英,陈建武,张 燕,余其兴. 2006. 生命科学研究中的标记技术. 包头医学院学报,22(1): 102-109
- 刘海映,王秀丽,田 燚,黄兴杰,王桂娥,李君丰,黄 勇. 2009. 成体对虾的荧光标记研究. 生物技术通报,4: 122-125
- 刘海映,王秀丽,李旭威,田 燚,王桂娥. 2009. 幼体中国对虾荧光标记虾的制作. 生物技术通报,10: 124-131
- 林元华. 1985. 海洋生物标志放流技术的研究状况. 海洋科学,9(5): 54-58
- 罗 坤,张天时,孔 杰,王清印. 2008. 中国对虾幼虾荧光体内标记技术研究. 海洋水产研究,29(3): 48-52
- 杨德国,危起伟,王 凯,陈细华,朱永久. 2005. 人工标志放流中华鲟幼鱼的降河洄游. 水生生物学报,29(1): 26-30
- 郝振林,张秀梅,张沛东,董晓煜,卞晓东. 2008. 金乌贼荧光标志方法的研究. 水产学报,32(4): 577-583
- 董智勇,吴常文,叶德锋. 2010. 曼氏无针乌贼荧光标记技术初步研究. 浙江海洋学院学报(自然科学版),29(2): 120-128
- 薄治礼,周婉霞. 2002. 石斑鱼增殖放流研究. 浙江海洋学院学报(自然科学版),21(4): 321-326
- Esben MO, Leif AV. 2001. An evaluation of visible implant elastomer for marking age-0 brown trout. N Am J Fish Manage 21(4): 967-970
- Godin DM, Cart WH, Hagino G and 3 others. 1995. Evaluation of a fluorescent elastomer internal tag in juvenile and adult shrimp *Penaeus vannamei*. Aquaculture 139(3-4): 243-248
- Fitz HC, Wiegert RG. 1991. Tagging juvenile blue crabs, *Callinectes sapidus*, with microwire tags: retention, survival, and growth through multiple molts. J Crustacean Biol 11(2): 229-235
- Jerry DR, Stewart T, Purvis IW and 1 other. 2001. Evaluation of visual implant elastomer and alphanumeric internal tags as a method to identify juveniles of the freshwater crayfish, *Cherax destructor*. Aquaculture 193(1-2): 149-154
- Okamoto K. 1999. Tag retention, growth, and survival of the swimming crab, *Portunus trituberculatus* marked with coded wire tags. Nippon Suisan Gakkaishi 65(4): 705-708