

鲫鱼幼鱼耳石荧光标记效果

邱晨^{①②} 姜涛^② 陈修报^② 刘洪波^② 朱亚华^① 杨健^{①②*}

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: 为确认茜素络合物对鲫 (*Carassius auratus*) 耳石进行有效标记的可行性, 以便为鲫甚至其他鲤科鱼类标志放流技术的开发及效果评估提供一定的借鉴, 本研究以孵出后 90 d 的鲫鱼幼鱼为研究对象, 设置单一浓度 (100 mg/L) 的茜素络合物浸泡标记 5 d, 分析茜素络合物在耳石上的沉积情况以及不同耳石在不同后续饲养天数的动态变化。结果表明, 矢耳石、微耳石和星耳石上在可见光、绿色和蓝色激发光下都检测到了良好的茜素络合物标记环, 标记率和存活率均为 100%。但不同耳石的茜素络合物标记效果不同, 荧光下, 星耳石的标记效果最显著, 微耳石次之; 可见光下, 微耳石的标记效果最好, 星耳石次之。随着后续饲养天数的延长, 可见光下标记逐渐减弱, 至 20 d 时基本消失, 而在绿色和蓝色激发光下标记环荧光强度无减弱迹象, 能长久保持, 且在蓝色激发光下标记环更易被观测到。上述结果结合鲫生长、存活和行为正常等情况综合显示, 在 100 mg/L 茜素络合物溶液中浸泡标记鲫鱼幼鱼 5 d, 其耳石可以获得满意的标记效果。

关键词: 鲫鱼; 标记; 耳石; 茜素络合物; 效果评价

中图分类号: Q958 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263 (2019) 05-678-09

Effect of Alizarin Complexone Marking for Otolith of Juvenile Crucian Carp *Carassius auratus*

QIU Chen^{①②} JIANG Tao^② CHEN Xiu-Bao^② LIU Hong-Bo^②
ZHU Ya-Hua^① YANG Jian^{①②*}

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, China*

Abstract: For assessing the feasibility of otolith alizarin complexone (ALC) marking of crucian carp *Carassius auratus* and providing a useful reference to develop batch marking technologies for the release and

基金项目 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (No. 2019JBFM06), 农业财政专项 (No. CJDC-2017-22);

* 通讯作者, E-mail: jiany@ffrc.cn;

第一作者介绍 邱晨, 女, 硕士研究生; 研究方向: 渔业生态环境监测与保护; E-mail: 657465328@qq.com。

收稿日期: 2019-05-27, 修回日期: 2019-07-23 DOI: 10.13859/j.cjz.201905008

enhancement of this species or even other cyprinidae fish, juvenile *C. auratus* (Fig. 1) were used to investigate the deposition of ALC onto otolith by immersing it in 100 mg/L for 5 d and the dynamic changes of ALC markings among three types of otoliths at different days of subsequent culture after the immersion. The results showed that ALC marking rings were detected on the sagittal, lapillus and asteriscus under visible light, green and blue excitation light with a marking rate of 100% without extra impact on survival and growth of the fish (Fig. 2). However, the marking effect of different otoliths was different. Under fluorescence, asteriscus showed the best marking effect, followed by lapillus, while under visible light, lapillus had the best marking effect, followed by asteriscus (Fig. 3). With the extension of the days of the subsequent culture, the visible light marker gradually weakened and almost disappeared at 20 d. However, under the green and blue excitation light, the fluorescence intensity of the ALC marking ring kept almost stable and was maintained for a long time (Table 1). Moreover, the marker ring could be easily observed under blue excitation light (Fig. 4). In combination with data of mortality, total length and body weight, it is believed that immersion by 100 mg/L ALC for 5 d can achieve satisfactory effect for otolith marking of juvenile *C. auratus*.

Key words: *Carassius auratus*; Mark; Otolith; Alizarin complexone (ALC); Effectiveness evaluation

目前,水生生物资源的养护已成为一项国策。全国各地都积极利用规模化增殖放流的手段来补充和恢复自然水域的鱼类等渔业资源。其中标志放流技术因可推算人工放流品种的种群数量和资源恢复中增殖放流的贡献率,进而为修复自然水域的渔业生态功能提供科学依据而广受关注(杨君兴等 2013)。

鲫 (*Carassius auratus*) 为辐鳍鱼纲 (Actinopterygii) 鲤形目 (Cypriniformes) 鲤科 (Cyprinidae) 鲫属的鱼类,为我国重要食用淡水鱼之一(李天宇 2016)。鲫人工繁殖技术的推广应用不仅增加了其经济和社会效益,也为其人工增殖放流提供了有利条件(潘绪伟等 2010, 杨君兴等 2013)。向自然水域放流鲫可增加其种群密度,提高渔获量,同时一些特有珍贵品种(如淇河鲫)的放流可达到恢复及保护其野生自然资源、维持生态平衡的目的(赵宏亮等 2007, 何俊等 2011)。利用标记技术来科学评估鲫增殖放流效果十分必要。至今,涉及鲫的相关技术主要以体外挂牌标记、剪鳍法等传统体外标记为主(俞豪祥等 1988)。上述方法虽具操作简便、成本低等优点,但具有易造成鱼机械性损伤、劳动强度大、保留率低、大规模标记困难等不足(周

永东等 2008)。

与挂牌标志法、剪鳍法等相比,荧光标记法被认为更为有效(潘绪伟等 2010, 耿倩等 2016),是一种可长期识别早期生活史个体的方法(Walt et al 2003, 靳建波等 2011, Lü et al 2017, 阙江龙等 2018)。荧光标记法是将荧光染料物质通过投喂、浸染或注射等手段使其附着沉积于标记目标的钙化组织(如鳞片、鳍条、耳石和其他硬骨组织)上,以便产生在荧光显微镜下可识别的荧光标记。使用该法能在短时间内对不同生活史阶段的鱼体(如受精卵、仔稚鱼、幼鱼等)实现大规模标记,且具有成本低、人工操作少、适用范围广、对标记目标鱼影响小、标记率和保持率高等优势(耿倩等 2016)。近年来,虽然一些鱼类基于其耳石特性已被应用于荧光物质(Yang et al 2016)标记等方面的探索(Warren-Myers 2018),但至今尚缺乏鲫的相关研究。

作为对鲫的初次探索,本研究拟在 100 mg/L 的茜素络合物(alizarin complexone, ALC)条件下浸泡标记鲫幼鱼,通过比较研究其矢耳石(sagitta)、星耳石(asteriscus)和微耳石(lapillus)三对耳石在不同光源下茜素络合物(ALC)标记效果,来探究鲫荧光标记的

可行性及评价其有效性。以期为开发有效的茜素络合物 (ALC) 鲫标记放流技术提供理论参考, 也希望为基于国家“十三五”水生生物增殖放流工作指导意见来为其他水生生物的增殖放流工作提供技术支撑。

1 材料与方 法

1.1 实验材料与设施

实验鱼采自于江苏省无锡市中国水产科学研究院淡水渔业研究中心南区实验基地, 为人工繁育的 40 尾健康鲫苗个体。按照我国学者常用的划分鱼类早期生活史阶段的方法 (曹文宣等 2007), 经观察, 本研究所使用的孵出后 90 d 的鲫, 体表已完全覆盖鳞片, 应属幼鱼阶段。所使用染色标记试剂为茜素络合物 (ALC) 溶液 (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)。整个实验在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自主研发的耳石化学标记系统 (LFER-OM-1901 型, 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心) 中进行 (图 1)。

1.2 浸泡标记实验与检测

1.2.1 实验设计 实验设计方案: (1) 实验前, 先将 40 尾实验鱼全都放入盛有曝气 2 d 以上自来水的玻璃缸中暂养 1 d, 期间不喂食。(2) 为尽可能保证耳石荧光标记, 在参考鲤 (*Cyprinus carpio*) 的研究经验 (邱晨等 2018) 基础上, 本研究仅设置单一浓度 (100 mg/L) 的茜素络

合物 (ALC) 来浸泡标记鲫幼鱼 5 d。具体为在标记系统一个标记缸内配置 10 L 的 100 mg/L 茜素络合物 (ALC) 溶液作为标记组, 同时选择一个内有 10 L 曝气自来水的空白缸作为空白对照组。各随机取规格基本一致的各 20 尾鲫幼鱼, 体长 (28.74 ± 1.32) mm, 体重 (0.307 ± 0.017) g, 分别放入对照组和标记组的玻璃缸内进行 5 d 的浸泡标记实验。浸泡标记期间向实验水体中充气增氧, 不喂食。(3) 浸泡标记结束后, 将对照组和标记组实验鱼分别置于标记系统一个盛有 100 L 曝气自来水的后续饲养缸中继续饲养, 投喂普通配合饲料。整个实验期间不控制水温和光周期, 为当季自然水温 ($28 \sim 32$ °C) 和自然光周期。每日清理排泄物及换水 1 次, 换水量占养殖水体的 25%。

样本鱼采集方式: 在后续饲养期间, 每隔 5 d 取一次样, 每次取 5 尾, 共计 20 d。取样同时使用电子天平 (FA2004N, 上海精密科学仪器有限公司, 0 ~ 200 g, 精度 0.1 mg) 和电子游标卡尺 (高精度 500-152 型, 日本 MITUTOYO 株式会社, 0 ~ 200 mm, 精度 0.02 mm) 分别测量样本鱼体重与全长, 备用。

1.2.2 耳石摘取、处理与检测 样本鱼在解剖镜下取出矢耳石、星耳石和微耳石三对耳石。先用去离子水清除耳石表面的薄膜及杂质, 再用无水乙醇脱水、干燥, 放在载玻片上用透明指甲油封片 (耳石未经打磨)。待指甲油凝固后, 在荧光显微镜 (Olympus BX51 型) 下, 分别



图 1 耳石化学标记系统 (a) 和实验鱼鲫 (b)

Fig. 1 The immersion system (a) and the juvenile crucian carp (*Carassius auratus*) (b) of this study

用可见光及 2 组荧光滤光片 (蓝色激发光和绿色激发光) 对耳石进行比较观察、拍照。参照王臣等 (2014) 的方法, 按未见 (0)、微弱 (1)、可见 (2)、明显 (3) 及强烈 (4) 5 个等级来记录茜素络合物 (ALC) 标记强度效果。

1.3 数据处理

利用 Excel2007 进行统计分析并作图, 并对死亡情况、体重和全长等相关数据进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异显著水平。

2 结果

2.1 茜素络合物标记后鲫幼鱼生存和生长状况

经 100 mg/L 茜素络合物 (ALC) 溶液浸泡 5 d 期间和后续饲养 20 d 期间, 未出现死亡, 活动及摄食等行为也均无异常。单因素方差分析显示, 后续饲养 20 d 期间标记组和对照组平均全长、平均体重 ($n = 5$) 无显著差异 ($P > 0.05$, 图 2)。说明本研究设定的浸泡标记浓度和浸泡时间对鲫幼鱼无明显毒性风险, 对其生长的额外影响也较小。

2.2 鲫幼鱼耳石茜素络合物标记效果

利用不同光源检测, 茜素络合物 (ALC) 标记效果不同。经茜素络合物 (ALC) 浸泡标记 5 d 后的鲫幼鱼耳石在不同光源下会形成颜色深浅不一的标记环带, 在可见光下, 可见紫红色标记环, 在蓝色和绿色激发光下标记环为

橘红色, 且在荧光检测时的标记率和强度都比可见光高。但相对于绿色激发光, 在蓝色激发光下, 标记环的颜色与耳石自身发出的荧光颜色 (绿色) 对比显著, 更易观察到 (表 1, 图 3)。因此, 在检测鲫耳石上的茜素络合物 (ALC) 标记环时使用蓝色激发光源更适宜且有效。下文中比较不同后续饲养天数下茜素络合物 (ALC) 标记效果研究均在蓝色激发光下进行。

不同耳石, 茜素络合物 (ALC) 标记效果不同。在荧光检测时, 茜素络合物 (ALC) 浸泡标记后的鲫幼鱼矢耳石、星耳石和微耳石三对耳石均呈现了不同标记强度的标记环, 星耳石的标记效果最显著, 微耳石次之 (表 1, 图 3)。但在可见光下, 茜素络合物 (ALC) 溶液对鲫幼鱼微耳石的标记效果最好, 星耳石次之, 矢耳石最差。

随着后续饲养天数的延长, 标记之后的耳石随鱼体生长而继续生长, 且标记效果差异越来越大。在可见光下标记强度随后续饲养进程逐渐减弱, 甚至消失, 在后续饲养第 20 天荧光检测时样品与对照组无异。在蓝色激发光下, 随着后续饲养天数的延长和耳石的生长, 相对于第 5、10、15 天检测, 第 20 天检测时耳石边缘已明显外移, 耳石边缘生长变宽, 耳石自发的绿色荧光与橙红色的茜素络合物 (ALC) 标记环颜色对比更清晰 (表 1, 图 4)。因此,

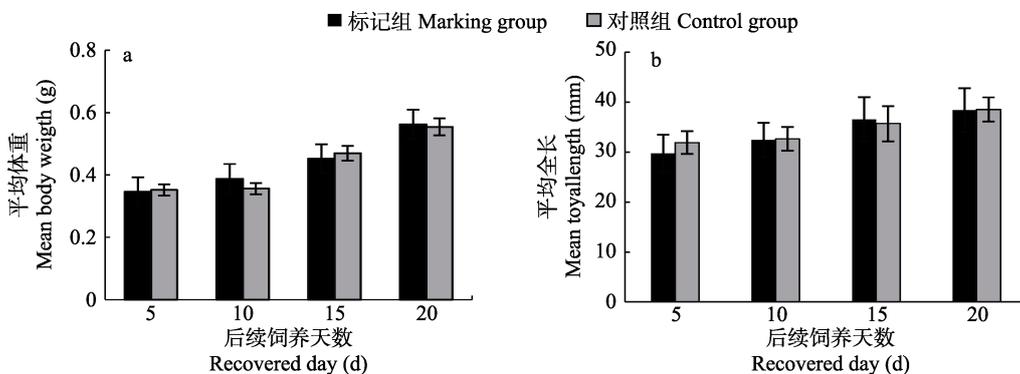


图 2 不同后续饲养天数时鲫体重 (a) 和全长 (b) 的变化 ($n = 5$)

Fig. 2 Changes on the body weight (a) and the total length (b) of the juvenile crucian carp (*Carassius auratus*) at different days of subsequent culture after the immersion ($n = 5$)

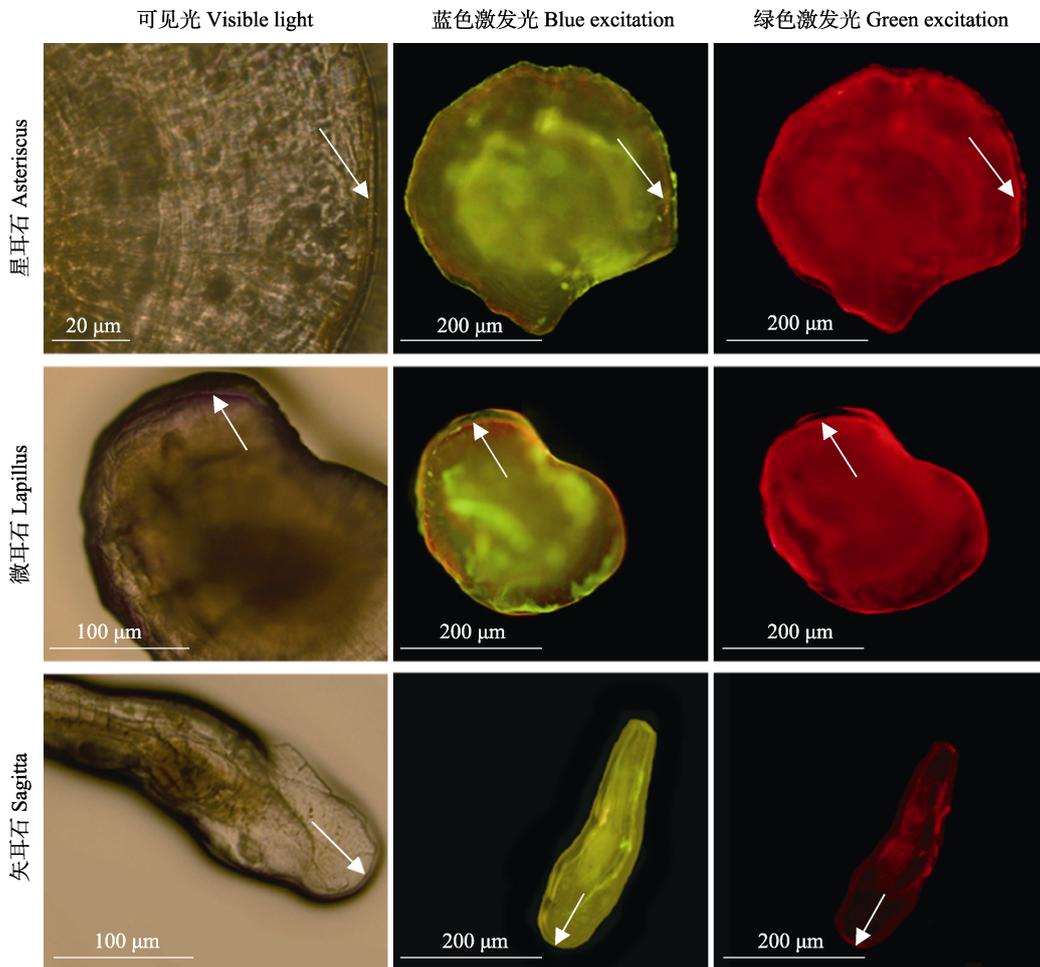


图 3 不同光源下后续饲养 10 d 时鲫幼鱼星耳石、微耳石和矢耳石上茜素络合物标记效果

Fig. 3 ALC marking effect under different light sources in asteriscus, lapillus and sagitta of the juvenile crucian carps (*Carassius auratus*) at 10 days of subsequent culture after the immersion

图中箭头指示标记轮边缘。Arrows point the edge of marking.

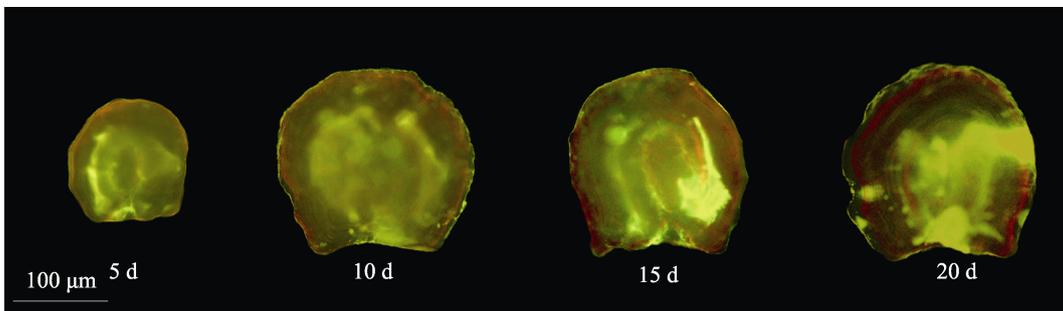


图 4 在蓝色激发光下不同后续饲养天数时鲫幼鱼星耳石茜素络合物标记效果

Fig. 4 ALC marking effect on asteriscus of the juvenile crucian carp (*Carassius auratus*) under different the days of recovered culture

表 1 鲫幼鱼耳石茜素络合物标记效果
Table 1 Marking effect of alizarin complexone (ALC) in otoliths of the juvenile crucian carp (*Carassius auratus*)

		后续饲养天数 Days of recovered culture (d)			
		5	10	15	20
采样数 (尾) Samples (ind)		5	5	5	5
标记率 Marking percentage (%)		100	100	100	100
可见光 Visible light	矢耳石 Sagitta	1	1	1	0
	微耳石 Lapillus	2	2	2	0
	星耳石 Asteriscus	1	1	1	0
绿色激发光 Green excitation	矢耳石 Sagitta	2	2	2	2
	微耳石 Lapillus	3	3	3	3
	星耳石 Asteriscus	3	3	3	3
蓝色激发光 Blue excitation	矢耳石 Sagitta	2	2	2	2
	微耳石 Lapillus	3	3	3	3
	星耳石 Asteriscus	4	4	4	4

表中三种光线条件下的数据为标记效果: 0. 未见; 1. 微弱; 2. 可见; 3. 明显; 4. 强烈。

Marking effect: "0" means none, "1" means faint, "2" means visible, "3" means obvious, "4" means strong.

为获得更好的标记轮观察效果, 浸泡标记后, 继续饲养 20 d 是有必要的。

3 讨论

3.1 影响鲫鱼耳石茜素络合物 (ALC) 标记强度因素

3.1.1 茜素络合物 (ALC) 标记浓度和浸泡时间

茜素络合物 (ALC) 标记被认为对鱼体造成的损害较小、安全性高, 已在多种鱼类耳石上获得了较为理想的标记效果 (欧阳斌等 1999, Lagardère et al 2000, 靳建波等 2011, 梁小双 2014, 王臣等 2014)。值得注意的是, 荧光物质浓度和浸泡时间对标记效果有决定性的影响, 荧光物质的浓度越高及浸泡时间越长, 染色效果越明显。但考虑到鱼体生理胁迫耐力, 尤其是对早期生活史个体进行浸泡时, 荧

光物质浓度不宜过高, 浸泡时间也不宜过长, 需要确定能够产生显著标记又没有致死影响的浸泡浓度和浸泡时间。阙江龙等 (2018) 利用 50、75、100 和 150 mg/L 的茜素络合物 (ALC) 溶液对 20 日龄的鳊 (*Aristichthys nobilis*) 幼鱼进行 8 h 浸泡标记来确定最佳浸泡浓度, 结果表明茜素络合物 (ALC) 溶液浓度不高于 100 mg/L 时, 存活率为 100%, 150 mg/L 浓度下幼鱼全部死亡, 且茜素络合物 (ALC) 在耳石上形成的标记环随着茜素络合物 (ALC) 浓度的增加, 在可见光下其标记色越来越明显, 100 mg/L ALC 标记效果最明显。王正鲲等 (2015) 用不同浓度梯度的茜素络合物 (ALC) 溶液对唐鱼 (*Tanichthys albonubes*) 幼鱼进行荧光标记, 得到最适的茜素络合物 (ALC) 浸泡液浓度为 100 mg/L, 存活率和耳石标记率均为 100%。同样, 欧阳斌等 (1999) 通过研究发现浸泡浓度为 50 ~ 100 mg/L 的茜素络合物 (ALC), 浸泡时间持续 6 ~ 24 h 的范围内, 稀有鮎鲫 (*Gobiocypris rarus*) 和彭泽鲫 (*C. auratus* var. *pengzesis*) 仔、稚鱼的荧光标记效果较好。虽然本研究目前仅设定了一个浸泡浓度和时间, 并未进行不同浓度和时间的比较实验, 但结合上述前人的研究来看, 选择 100 mg/L ALC 标记浓度是合理的, 且该浓度下浸泡 5 d (虽然较上述文献中的要长) 已经可以获得足够满意的标记效果了。当然, 在下一步工作, 笔者将进行不同发育阶段鲫在不同浓度茜素络合物 (ALC) 和不同时间梯度浸泡条件的比较研究, 以便确定最适的鲫茜素络合物 (ALC) 标记规格及浸泡浓度和时间, 并尝试建立相应的实用性操作规范。

3.1.2 ALC 标记鱼日龄规格

增殖放流时, 一般选择 3 ~ 5 mm 的早期生活史个体进行放流, 且鱼的标记日龄越大, 荧光标记效果越差, 这是由荧光物质沉积在鱼类耳石中的原理决定的。鱼体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, 在标记目标身体的骨质结构上的钙离子形成稳定的螯合复合物, 从而在其骨组织上逐渐生成一个荧光生长标记环。而标记鱼的日龄越大, 其新陈代谢降低, 碳酸钙沉积随之减慢, 使得耳石对荧光物质的沉积率降低, 荧光环变小或变淡 (Bevelander et al 1962, Poczyczyński et al 2011, 徐永江等 2016)。因此, 在利用一定浓度茜素络合物 (ALC) 进行短期浸泡标记时, 应慎重考虑标记鱼规格。徐永江等 (2016) 采用茜素络合物 (ALC) 浸泡标记半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*) 苗种耳石, 发现茜素络合物 (ALC) 对 70 d 鱼苗的标记效果好于 170 d 鱼苗。王正鯤等 (2015) 也发现, 茜素络合物对唐鱼耳石染色的适宜浓度随日龄增大而增加。赵亚鹏等 (2013) 利用茜素络合物 (ALC) 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, 并认为原因可能是低日龄苗种个体小, 浸泡标记期间饲养密度更大, 对于单位体积中荧光染料的利用效率可能会更高。Secor 等 (1991) 也认为, 不同鱼龄个体之间标记效果的差异也许和代谢有关, 低龄鱼比高龄鱼的代谢速率更高, 吸收荧光物质可能会更多一些。

综上, 由于标记效果受荧光物质、浸泡浓度及时间和鱼龄等因素影响, 因此在对鲫鱼早期鱼苗进行荧光浸泡标记时应充分考虑这些因素。本研究结果显示, 使用 100 mg/L 的茜素络合物 (ALC) 对鲫幼鱼进行 5 d 浸泡标记, 浸泡期间和后续饲养期间都未有死亡, 且三对耳石上的荧光标记环呈“鲜艳”的个体数达 100%, 表明选择 100 mg/L 的茜素络合物 (ALC) 进行 5 d 的浸泡标记是有效的。同时考虑到鲫放流规格上的要求, 将对鲫鱼仔稚鱼荧光标记的适宜标记浓度和浸泡时间作进一步研究, 探究不同浸泡浓度和时间梯度下的标记效果, 以期最终解决鲫鱼规模化人工放流早期鱼苗的化学标记问题。

3.2 鲫不同耳石上茜素络合物 (ALC) 标记差异性和持久性

相较于蓝色和绿色激发光, 可见光下的荧光标记非常弱, 虽然可以被观察到但不及前两者明显 (图 3)。但是, 相较于两种激发光, 可见光可以同时清晰地观察到耳石上的日轮信息, 从而便于获取鱼体其他信息。值得注意的是, 在可见光源下鲫幼鱼的三对耳石中, 茜素络合物 (ALC) 溶液对微耳石的标记效果最好, 星耳石次之, 矢耳石最差。这可能与不同的耳石的厚薄程度或普通光源的穿透能力有关 (王正鯤等 2015)。鲫矢耳石较其他耳石厚, 同时星耳石虽然增厚速度比矢耳石相对较慢, 但两者标记环均不易在普通光学显微镜下识别; 而微耳石形成时间相对较晚, 整体薄而透明, 标记环易在普通光学显微镜下识别 (向德超等 1997)。因此, 如果是需要观察耳石日轮的同时, 进行荧光比较的检查, 可以考虑选用微耳石。

虽然可见光下可以观察到荧光标记, 但是在特定的诱导激发光 (如本研究中的蓝色和绿色激发光) 下荧光标记信号更强, 可以被更为明显、清晰地被观察到 (Taylor et al 2010, Yang et al 2016, Yang et al 2017)。值得注意的是由于不同耳石上荧光物质的沉积率可能不同, 造成不同耳石表达出来的荧光标记效果存在差异。在进行蓝色和绿色激发光检测时, 星耳石上的荧光标记最易被观测到, 其次为微耳石, 矢耳石相对较差。考虑到取样、处理和观察的难易程度, 矢耳石细长, 摘取和处理时易碎, 星耳石和微耳石形状呈扁平状, 易于观察和磨片。但微耳石在三类耳石中最小, 尤其是淡水鱼类, 不易取得, 而星耳石相对更大, 采取容易 (向德超等 1997)。因此, 选取星耳石用于鲤科鱼类荧光标记观测, 不失为一个良好的耳石样本材料。这与沈建忠等 (2002) 建议使用星耳石鉴定鲫年龄的结果一致。至于星耳石是否为鲤科鱼类荧光标记最好的“靶器官”, 还需要有更多研究数据的积累。

一般认为荧光在强光下会“褪色” (Hoyland

1999), 然而, Bashey (2004) 认为仅仅有强光, 是不足以解释荧光斑纹的消失, 因为鱼在没有强光条件下生存也会使荧光斑纹丢失。若在遮蔽阳光的环境下, 饲养的鱼暴露在高于正常温度的环境中, 这可能会由于骨骼钙的高周转率而导致标记丢失。但 Tsukamoto (1995) 通过茜素络合物 (ALC) 浸泡标记实验, 表明马苏大麻哈鱼 (*Oncorhynchus masou*) 耳石上形成的茜素络合物 (ALC) 荧光标记至少可以持续保留 3 年以上。而本研究发现, 利用茜素络合物 (ALC) 浸泡标记鲫幼鱼耳石后后续饲养 20 d 时, 耳石上形成的荧光标记清晰可见, 未有减弱趋势, 说明荧光标记具长久性。后期, 将进行茜素络合物 (ALC) 浸泡标记后长时间后续饲养研究, 以探究茜素络合物 (ALC) 溶液对鲫耳石的标记能否持续更长时间。但结合本研究与其他鱼种标记结果来看, 茜素络合物 (ALC) 对鲫鱼耳石的标记效果是可以长期保持的, 该标记方法可用于鲫苗种的标志放流和增殖效果评估。

参 考 文 献

- Bevelander G, Goss R J. 1962. Influence of tetracycline on calcification in normal and regenerating teleost scales. *Nature*, 193(4820): 1098–1099.
- Bashey F. 2004. A comparison of the suitability of alizarin red S and calcein for inducing a nonlethally detectable mark in juvenile guppies. *Transactions of the American Fisheries Society*, 133(6): 1516–1523.
- Hoyland J. 1999. Fluorescent probes in practice: potential artifacts // Mason W T. *Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity*. San Diego: Academic Press, 108–113
- Lagardère F. 2000. Feasibility of otolith markings in large juvenile turbot, *Scophthalmus maximus*, using immersion in alizarin-red S solutions. *ICES Journal of Marine Science*, 57(4): 1175–1181.
- Lü H, Chapelsky A, Zhang Z, et al. 2017. Can calcein and alizarin complexone be used for double immersion marking of juvenile qingbo *Spinibarbus sinensis*? *Fisheries Science*, 83(6): 767–776.
- Poczyczyński P, Kozłowski K, Kozłowski J, et al. 2011. Marking and return method for evaluating the effects of stocking larval vendace, *Coregonus albula* (L.), into Lake Wigry in 2000–2001. *Archives of Polish Fisheries*, 19(4): 259–265.
- Secor D H, Miller G W, John M D. 1991. Immersion marking of larval and juvenile hatchery-produced striped bass with oxytetracycline. *Transactions of The American Fisheries Society*, 120(2): 261–266.
- Taylor M D, Fielder D S, Suthers I M. 2010. Batch marking of otoliths and fin spines to assess the stock enhancement of *Argyrosomus japonicus*. *Journal of Fish Biology*, 66(4): 1149–1162.
- Tsukamoto K. 1995. Use of otolith-tagging in a stock enhancement program for masu salmon (*Oncorhynchus masou*), in the Kaji River, Japan // Secor D H, Dean J M, Campana S E. *Recent Developments in Fish Otolith Research*. Columbia: University of South Carolina Press, 403–422.
- Walt B V D, Faragher R A. 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.
- Warren-Myers F, Dempster T, Swearer S E. 2018. Otolith mass marking techniques for aquaculture and restocking: benefits and limitations. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 28(3): 485–501.
- Yang K, Zeng R, Gan W, et al. 2016. Otolith fluorescent and thermal marking of elongate loach (*Leptobotia elongata*) at early life stages. *Environmental Biology of Fishes*, 99(8/9): 687–695.
- Yang K, Li S, Liu X, et al. 2017. Mass marking of juvenile *Schizothorax wangchiachii* (Fang) with alizarin red S and evaluation of stock enhancement in the Jinping area of the Yalong River. *PeerJ*, 5(12): e4142.
- 曹文宣, 常剑波, 乔晔, 等. 2007. 长江鱼类早期资源. 北京: 中国水利水电出版社, 172–174.
- 耿倩, 张淑荣, 段妍, 等. 2016. 荧光标记技术在增殖放流中的应用现状. *水产科学*, 35(3): 308–312.
- 何俊, 谷孝鸿, 张宪中. 2011. 太湖自然渔业结构特征及其变化驱动机制研究. *江苏农业科学*, 39(3): 287–291.
- 靳建波, 危起伟, 孙庆亮, 等. 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): 10–16.

- 李天宇. 2016. 浅谈池塘主养鲫鱼养殖技术. 农业开发与装备, (12): 190.
- 梁小双. 2014. 红鳍笛鲷荧光标记技术的研究. 南宁: 广西大学硕士学位论文.
- 欧阳斌, 常剑波. 1999. 荧光物质浸泡标记稀有鮰鲫和彭泽鲫仔、稚鱼. 水生生物学报, 23(4): 324–349.
- 潘绪伟, 杨林林, 纪炜炜, 等. 2010. 增殖放流技术研究进展. 江苏农业科学, (4): 236–240.
- 邱晨, 姜涛, 陈修报, 等. 2018. 茜素络合物对鲤仔鱼耳石标记特征研究. 水产学报, 42(11): 1754–1765.
- 阙江龙, 陶志英, 王生, 等. 2018. 茜素络合物对鳊耳石的标志效果研究. 江西水产科技, (3): 13–17.
- 沈建忠, 曹文宣, 崔奕波. 2002. 鲫耳石年轮的观察及其确证. 华中农业大学学报, 21(1): 64–68.
- 王臣, 刘伟, 王继隆, 等. 2014. 大麻哈鱼胚胎耳石的茜素红标记及其效果评价. 中国水产科学, 21(6): 1268–1276.
- 王正鲲, 赵天, 林小涛, 等. 2015. 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, 34(1): 189–194.
- 向德超, 何竹, 朱杰, 等. 1997. 鲫鱼耳石日轮研究. 西南大学学报: 自然科学版, 19(5): 451–454.
- 徐永江, 柳学周, 史宝, 等. 2016. 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, 37(6): 11–18.
- 杨君兴, 潘晓赋, 陈小勇, 等. 2013. 中国淡水鱼类人工增殖放流现状. 动物学研究, 34(4): 267–280.
- 俞豪祥, 张海明, 林莲英, 等. 1988. 七种鲤科鱼类标志的研究. 水生生物学报, 12(3): 268–271.
- 赵宏亮, 肖调义. 2007. 淇河鲫鱼资源现状及保护对策. 河南水产, (3): 5–6.
- 赵亚鹏, 潘晓赋, 杨君兴, 等. 2013. 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, 34(5): 499–503.
- 周永东, 徐汉祥, 戴小杰, 等. 2008. 几种标志方法在渔业资源增殖放流中的应用效果. 福建水产, (1): 6–12.