

## 鳊鱼仔稚鱼耳石的标记和其日轮的确证

宋昭彬 曹文宣

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

**摘要** 用茜素络合物对鳊鱼仔鱼进行了浸泡标记, 耳石上能检测到橘红色荧光标记环. 100mg/L 茜素络合物溶液的标记效果较差; 120mg/L 和 150mg/L 溶液浸泡后微耳石的标记率很高, 矢耳石和星耳石的标记率低. 标记后耳石上的生长轮数与饲养天数间呈一一对应关系, 相关方程为:  $N = 0.2663 + 0.9276D$  ( $n = 68$ ,  $r^2 = 0.9664$ ). 方程的斜率 0.9276 与 1 无显著差异, 证明生长轮确系日轮. 鱼体长与微耳石、矢耳石及星耳石的直径间呈显著的线性关系, 相关方程为:  $BL = 66.8723LD + 2.7064$  ( $n = 73$ ,  $r^2 = 0.8867$ ),  $BL = 22.7839SD + 6.6066$  ( $n = 49$ ,  $r^2 = 0.8525$ ),  $BL = 47.6079AD + 3.5660$  ( $n = 71$ ,  $r^2 = 0.9012$ ).

**关键词** 茜素络合物, 标记, 日轮, 鳊鱼, 仔、稚鱼

继 Pannella 在观察几种冷水性鳊鱼耳石时首先发现日轮后<sup>[1]</sup>, 国内外学者分别证实了许多鱼类的耳石生长轮为日轮<sup>[2,3]</sup>. 当今, 鱼类耳石上存在日轮已被证明是一种普遍现象<sup>[4]</sup>. 耳石微结构的检测与分析被广泛应用于鱼类生态学和渔业生物学的研究中<sup>[5]</sup>.

鳊鱼 (*Elopichthys bambusa* Richardson) 是生活在江河、湖泊中的中上层凶猛鱼类, 孵化后不久就开始捕食其它鱼类, 能起到淘汰病、弱和抑制小杂鱼类过量繁殖的作用<sup>[6]</sup>, 对维持水体生态平衡有重要意义. 检测和分析鳊鱼耳石的微结构特征, 将推动其早期生活史阶段的年龄、生长、死亡及年级补充量的研究, 对渔业资源管理有重要作用. 目前, 鳊鱼的人工繁殖尚待解决, 本文报道用荧光物质标记来确证其仔、稚鱼耳石生长轮沉积的规律.

### 1 材料与方法

**1.1 实验鱼来源** 鳊鱼仔鱼为 1999 年 5-6 月从长江中游洪湖江段渔民弼网中获得的自然繁殖个体, 发育期在鳃二室到腹鳍芽期之间<sup>[7]</sup>.

**1.2 标记方法和饲养管理** 用茜素络合物 (Alizarin complexone, ALC) 溶液对仔鱼进行浸泡标记, 浸泡浓度和持续时间见表 1. 其中, 100mg/L 的溶液用澄清江水配制, 120mg/L 和 150mg/L 的溶液用曝气自来水配制. 5 月 16 日的样本先用 100mg/L 的浓度浸泡, 饲养 7 天后再用 120mg/L 的浓度进行二次浸泡. 浸泡结束后立即用曝气自来水清洗鱼苗, 然后饲养在 6.65L 的圆形玻璃缸中, 每天换澄清江水或曝气自来水约 2/3, 投喂从江中捞到的野杂鱼的仔、稚鱼. 分早晚两次测定玻璃缸中的水温.

表 1 采样日期、标记日期、浸泡浓度、浸泡持续时间及饲养水温

Tab.1 Sampling date, marking date, immersing concentration, lasting time, and rearing temperature of larval *Elopichthys bambusa*

采样日期 sampling date	标记日期 marking date	浸泡浓度(mg/L) immersing concentration	浸泡持续时间(h) lasting time	饲养水温(℃) rearing temperature
1999.5.16	1999.5.17	100	24	19.7-22.2
1999.5.16	1999.5.25	120	24	21.5-26.9
1999.6.3	1999.6.5	150	24	22.3-25.7
1999.6.13	1999.6.15	150	24	22.7-25.5

**1.3 取样和测定** 每隔 4d 取样, 每次取 5 尾, 测量体长, 精确到 0.1mm, 然后保存在 95% 酒精中. 饲养中发现的死亡个体及时取出, 记录死亡日期并保存样本, 以备确证日轮时使用. 实验完毕后, 将鱼苗样本置于双筒解剖镜下, 用解剖针剥取三对耳石, 经无水酒精清洗、晾干, 二甲苯透明后, 用中性树胶封于载玻片上保存, 以备检测荧光标记和统计生长轮的数量. 在显微镜下, 用接目镜测微尺测量耳石直径, 长圆形或不规则形耳石测量长直径, 精确到 0.001mm.

**1.4 荧光检测和生长轮计数** 在 OPTON 荧光显微镜下用紫外光检测耳石的标记效果并拍摄照片. 根据荧光强度, 将标记效果记为无标记、弱、可视、明显和鲜艳五个等级. 用可见光和荧光交替对照观察, 统计微耳石上标记后的生长轮数, 每个样本统计三次, 取平均值作为生长轮的记数结果.

**1.5 数据处理** 用 Statistica 软件统计分析标记后耳石生长轮数与饲养天数的关系, 以及体长与耳石直径的关系.

## 2 研究结果

### 2.1 标记效果

经茜素络合物溶液浸泡后的仔、稚鱼, 将其耳石样本置于荧光显微镜下, 用紫外激发光观察, 能检测到橘红色标记环(图 1: a、b), 有些样本在可见光下观察, 还能发现对应于荧光标记带有可识别的标记轮(图 1: c).

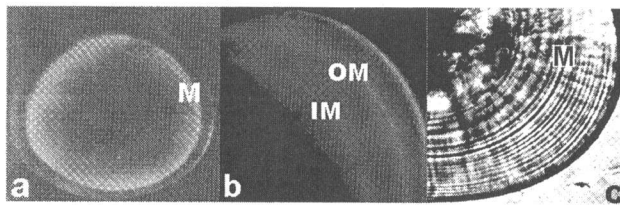


图 1 茜素络合物标记后的微耳石

a. 单标记, M: 标记环; b. 双重标记, IM: 内标记环, OM: 外标记环; c. 可见光观察, M: 标记轮

Fig.1 The lapillus marked by alizarin complexone

a. single mark(M); b. double marks (IM:inner mark, OM:outer mark); c. the mark (M) viewed under visible light

先后经 100 mg/L 和 120 mg/L 茜素络合物溶液浸泡处理的样本,少数个体的耳石上具有双重标记环,且外环的荧光反应明显强于内环(图 1: b). 浸泡浓度为 100mg/L 时,仅有少数个体的耳石上能检测到荧光. 浸泡浓度为 120mg/L 和 150mg/L 时,微耳石的标记率分别为 93.1% 和 100%, 矢耳石的标记率分别为 44.83% 和 58.06%, 星耳石的标记率不到 10%. 相同浸泡浓度下,不同个体之间耳石上的荧光反应强度差别很大,但多数个体耳石上标记环的荧光反应都比较弱(图 2).

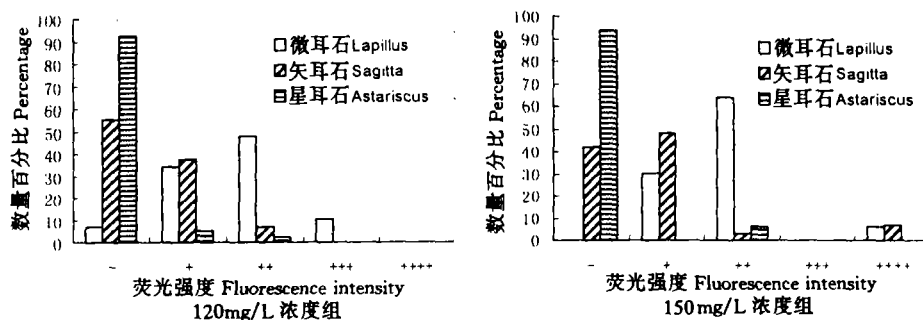


图 2 不同浓度茜素络合物溶液浸泡后耳石的标记效果和标记率

- 无标记 + 弱 ++ 可脱 +++ 明显 ++++ 鲜艳

Fig.2 Marking effects and the percentage of marked otoliths while immersing the larval *E. bambusa* in various concentrations of ALC solution

- no mark + faint mark ++ light mark +++ good mark ++++ bright mark

## 2.2 耳石生长轮数与饲养天数的关系

微耳石上标记后的生长轮数(N)和相应的饲养天数(D)间呈直线相关, 相关方程为:  $N = 0.2663 + 0.9276D$  ( $n = 68, r^2 = 0.9664$ ). 方程的斜率 0.9276 接近于 1 (t-检验,  $P = 0.66$ ), 表明耳石生长轮数和仔、稚鱼日龄间呈一一对应关系, 生长轮具有日沉积规律, 可确认为日轮(图 3).

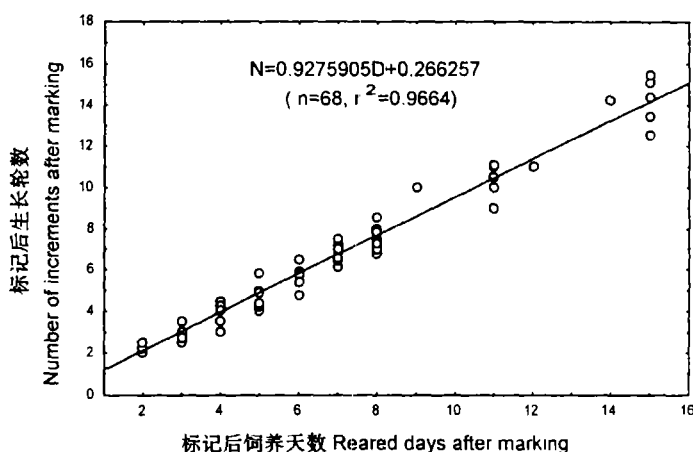


图 3 标记后耳石生长轮数和饲养天数间的关系

Fig.3 Relationship between the number of growth increments in otolith and reared days after marking

### 2.3 鱼体大小与耳石大小的关系

用 LD、SD 和 AD 分别表示微耳石、矢耳石和星耳石的直径(mm), 经回归分析得到, 它们与体长(BL; 单位 mm)呈显著的直线相关( $P < 0.0001$ )(图 4), 相关方程如下:

$$BL = 66.8723LD + 2.7064 \quad (n = 73, r^2 = 0.8867)$$

$$BL = 22.7839SD + 6.6066 \quad (n = 49, r^2 = 0.8525)$$

$$BL = 47.6079AD + 3.5660 \quad (n = 71, r^2 = 0.9012)$$

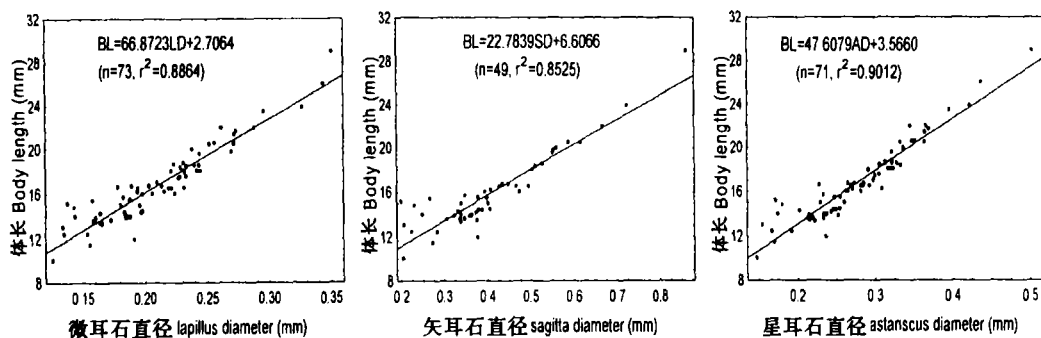


图 4 体长与耳石直径的关系

Fig. 4 Relationship between body length and otolith diameter

### 3 讨论

在鱼类日龄的研究中, 国际上常用四环素(Tetracycline)、茜素络合物和钙黄绿素(Calcein)等荧光标记物质对仔、稚鱼进行标记<sup>[8-10]</sup>. 作者采用茜素络合物溶液浸泡鳊鱼仔、稚鱼, 也获得了可资识别的标记. 此外, Vigliola<sup>[11]</sup>、欧阳斌等<sup>[9]</sup>曾报道用茜素络合物标记仔、稚鱼后, 在可见光下也能检测到紫红色的标记环. 尽管作者没有观察到这一现象, 但将茜素络合物标记后的耳石样本置于可见光下观察, 却发现有些样本在对应于荧光标记的位置具有一个深黑色的标记轮. 这说明荧光物质的浸泡对耳石沉积的生理过程具有一定的影响.

值得注意的是, 鳊鱼仔、稚鱼的不同个体对荧光物质浸泡的敏感程度差异很大, 在同一种浸泡浓度下, 不同个体的耳石上产生的标记环的强弱不同, 而且不同耳石的标记率也不一样. 当浸泡浓度为 120mg/L 和 150mg/L 时, 微耳石的标记率分别可达 93.1% 和 100%, 矢耳石的标记率只有 44.83% 和 58.06%, 星耳石的标记率则低于 10%. 由此可见, 微耳石是最合适的检测荧光标记存在与否的靶器官. 此外, Victor 等发现, 小眼须雅罗鱼(*Semotilus corporalis*)矢耳石的轮纹不清, 并认为, 可能所有鲤科鱼类的矢耳石都不适合于鉴定年龄, 而应该用微耳石<sup>[12]</sup>; Mugiya 等发现, 鲫鱼(*Carassius auratus*)微耳石形状比较稳定, 最适于日龄研究<sup>[13]</sup>; 常剑波等也认为, 草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)适合于日龄研究的耳石为微耳石<sup>[3]</sup>. 与上述鱼类相仿, 鳊鱼微耳石的形状发育比较规则, 矢耳石随日龄的增长形状变化较大, 星耳石则在孵出后数天才出现, 且其上轮纹不清楚. 因此, 无论从标记的角度, 还是日龄鉴别计数的角度, 进行鳊鱼的日龄研究都以选择微耳石为宜.

利用耳石日轮,我们能准确鉴定鳊鱼的日龄、推算其繁殖时间和产卵批次.此外,本文的研究还表明,鳊鱼仔、稚鱼的生长与耳石生长呈显著的线性关系,故可以用耳石日轮来退算其早期生长,这又为研究其早期生活史阶段的生长特征和规格选择性死亡等问题提供了便利.

## 参 考 文 献

- [1] Pannella G. Fish otoliths: daily growth layers and periodical patterns. *Science*, 1971, **173**: 1124-1127
- [2] Jones C. Determining age of larval fish with the otolith increment technique. *Fish. Bull. U. S.*, 1986, **84**: 91-103
- [3] 常剑波,邓中舜,孙建貽等.草鱼仔幼鱼耳石日轮及日龄研究.中国动物学会成立60周年;纪念陈桢教授诞辰100周年论文集,1994,323-329
- [4] Campana S E, Neilson J D. Microstructure of fish otoliths. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 1985, **42**: 1014-1032
- [5] Jones C M. Development and application of the otolith increment technique. p. 1-11. In Stevenson D K, Campana S E [ed.]. *Otolith microstructure examination and analysis. Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci.*, 1992, **117**: 126p
- [6] 朱宁生,陈宏溪.梁子湖中鳊鱼的食性.水生生物学集刊,1959,3:262-271
- [7] 梁秩棠,易伯鲁,余志堂.长江干流和汉江的鳊鱼繁殖习性及其胚胎发育.水生生物学集刊,1984,8(4):389-400
- [8] 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.
- [9] Wilson C A, Beckman D W, Dean J M. Calcein as a fluorescent marker of larval and juvenile fish. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 1987, **116**: 668-670
- [10] Tsukamoto K. Otolith tagging of ayu embryo with fluorescent substances. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1988, **54**: 1289-1295
- [11] Vigliola L. Validation of daily increment formation in otoliths for three *Diplodus* species in the Mediterranean sea. *J. Fish Biol.*, 1997, **51**: 349-360
- [12] Victor B C, Brothers E B. Age and growth of the fallfish *semotilus corporalis* with daily otolith increments as a method of annulus verification. *Can. J. Zool.*, 1982, **60**: 2543-2550
- [13] Mugiya Y, Tanaka S. Otolith development, increment formation, and an uncoupling of otolith to somatic growth rates in larval and juvenile goldfish. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1992, **58**: 845-851

## OTOLITH MARKING AND DAILY INCREMENT VALIDATING IN LARVAL AND JUVENILE YELLOWCHEEK CARP, *ELOPICHTHYS BAMBUSA*

Song Zhaobin and Cao Wenxuan

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

**Abstract** A total of 74 wild larvae of yellowcheek carp (*Elopichthys bambusa*) were collected in the Honghu section of the Yangtze River on May 16, June 3 and 13, 1999. The larvae collected on May 16 were immersed in 100mg/L alizarin complexone (ALC) solution for 24 hours, then in 120mg/L ALC solution for 24 hours seven days later. The larvae collected on June 3 and 13 were immersed in 150mg/L ALC solution for 24 hours. Under UV light, scarlet-pink fluorescent zones were observed on otoliths. Only a few otoliths could be marked when immersed in 100mg/L ALC solution. When immersed in 120mg/L and 150mg/L ALC solutions, 91.3% and 100% lapillus, 44.83% and 58.06% sagitta, and less than 10% astariscus were marked, respectively. The relationship between increments in lapillus (N) and the rearing days (D) could be expressed as  $N = 0.2663 + 0.9276D$  ( $n = 68$ ,  $r^2 = 0.9664$ ). The slope 0.9276 was not significantly different from 1. That means the increments in lapillus formed daily in larval and juvenile stages of the fish. The relationships between body length (BL) and diameters of lapillus (LD), sagitta (SD), astariscus (AD) could be expressed as  $BL = 66.8723LD + 2.7064$  ( $n = 73$ ,  $r^2 = 0.8867$ ),  $BL = 22.7839SD + 6.6066$  ( $n = 49$ ,  $r^2 = 0.8525$ ) for, and  $BL = 47.6079AD + 3.5660$  ( $n = 71$ ,  $r^2 = 0.9012$ ), respectively.

**Key words** Alizarin complexone, Marking, Daily growth increments in otolith, Larval and juvenile *Elopichthys bambusa*