

荧光物质浸泡标记稀有鮡鲫 和彭泽鲫仔、稚鱼^{*}

欧阳斌 常剑波

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

摘要 研究了茜素络合物和盐酸四环素对稀有鮡鲫和彭泽鲫仔、稚鱼进行浸泡标记的方法和效果。茜素络合物在浸泡浓度 50—100mg/L, 浸泡时间持续 6—24h 的范围内, 对两种鱼都有很好的标记效果; 盐酸四环素在浸泡浓度 150—250mg/L, 浸泡时间 12—24h 的范围内, 对彭泽鲫有较好的标记效果, 但对稀有鮡鲫有极高的致死率。在荧光显微镜下观察, 茜素络合物呈橘红色、盐酸四环素标记区呈金黄色荧光反应。

关键词 茜素络合物, 盐酸四环素, 标记, 仔、稚鱼

常用的荧光标记化合物有茜素络合物(Alizarin complexone)、四环素(Tetracycline)和钙黄绿素(Calcein)等。对小而娇嫩的仔、稚鱼进行浸泡, 需要解决的关键问题是标记物质的选择、能够产生标记又没有致死影响的浸泡浓度和浸泡时间的确定。这些都因鱼类的种类、个体大小规格和实验条件不同而异。客观来说, 对鱼类仔、稚鱼的大规模浸泡标记大多数还停留在实验阶段。尽管许多学者都作了在鱼类早期生活史阶段使用荧光化合物浸泡成功标记耳石等靶器官的报道, 但针对荧光化合物浸泡标记存在的缺陷, 如四环素会浸泡导致仔、稚鱼的死亡率上升, 以及同一化合物对不同种类标记的效果不一致等, 都提出了慎重应用的建议^[1-4]。Tsukamoto^[5]认为对香鱼而言, 使用茜素络合物比四环素有更低的致死率; Wilson 等则提出使用钙黄绿素标记可能比茜素络合物或四环素更好。

国内除少数研究者曾应用荧光浸泡标记以确证日轮外^[6], 尚未见对鱼类荧光浸泡方法和标记效果的研究。故此本文报道以稀有鮡鲫(*Gobiocypris rarus* Ye et Fu)和彭泽鲫(*Carassius auratus pengze* Var.)的仔、稚鱼为材料, 利用茜素络合物和盐酸四环素对鱼类进行荧光浸泡的研究结果, 以推进我国类似研究的深入开展。

1 材料和方法

1.1 材料 稀有鮡鲫和彭泽鲫的仔、稚鱼均由中国科学院水生生物研究所有关实验室提供。仔、稚鱼孵出后暂养在 40 × 30 × 50cm³ 的水族箱中, 每日换水约 1/4, 清除脏物。每日

^{*} 国务院三峡办和中国长江三峡工程开发总公司资助(三环科1-03-02-01)

稀有鮡鲫由王剑伟博士提供、彭泽鲫由曾志强博士提供, 在此一并致谢

1998-08-07收到; 1999-06-17修回。

投喂在池塘中捞取的浮游生物及人工孵化的卤虫(*Artemia*, 虫卵来自天津塘沽)无节幼体各一次, 投饵略有剩余。标记前将实验鱼移至直径为 20cm 的圆形结晶皿中暂养 2d。每个结晶皿 10 尾, 注曝气自来水 1L。实验期间不控温, 水温自然变幅为 21.4—26.0℃。浸泡时稀有鮕鲫为 14—19 日龄, 体长 7.52mm(6.64—8.10mm); 彭泽鲫 13—20 日龄, 体长 8.65mm(6.70—11.00mm)。

1.2 试剂浸泡液配制 盐酸四环素和茜素络合物分别为德国和上海试剂三厂生产, 均为分析纯粉剂。先将盐酸四环素和茜素络合物溶于蒸馏水中, 分别配成 1000mg/L 和 500mg/L 母液, 然后用母液加曝气的自来水按实验方案稀释配制不同浓度的浸泡液。溶液的 pH 值用 NaHCO_3 缓冲液调节至接近于中性。茜素络合物不易溶于水, 在配制溶液的过程中要加温才能完全溶解。

1.3 实验方案 茜素络合物浸泡液设置和盐酸四环素浸泡液设置见表 1, 2。标记溶液的体积均为 500ml, 浸泡数量为 10 尾、浸泡密度为 20 尾/L。浸泡过程中的死亡个体及时取出保存在 95% 的酒精中, 实验完成后将鱼移回原暂养的结晶皿, 养殖 4—10d 后取样, 也用 95% 的酒精保存。由于实验材料所限, 每种鱼没有进行浸泡浓度梯度的试验。

1.4 耳石制备和荧光标记的检测 将实验鱼体置于载玻片上, 在双筒解剖镜下用两根解剖针摘出微耳石、矢耳石和星耳石。用蒸馏水清洗干净, 100% 酒精脱水、干燥。然后用二甲苯透明, 中性树脂包埋。置荧光显微镜下, 用紫外激发光源观察。

2 结果

2.1 浸泡液的安全浓度

茜素络合物浸泡液的浓度为 200mg/L 时, 稀有鮕鲫和彭泽鲫均出现 100% 的死亡率。浓度 30—150mg/L, 成活率大多达到 100%, 只有稀有鮕鲫在 150mg/L, 浸泡 24h, 成活率为 80%; 彭泽鲫在 150mg/L, 浸泡 24h, 成活率为 60%。用盐酸四环素浸泡稀有鮕鲫, 浓度 150—500mg/L, 时间 12h, 均出现 100% 的死亡率。而浸泡彭泽鲫时, 浓度 50—250mg/L, 100% 成活; 浓度为 300—400mg/L, 成活率为 50—90%, 浓度大于 450mg/L 时, 死亡率为 100%。浸泡后养殖期间均无死亡现象发生。

2.2 标记效果

2.2.1 茜素络合物 除浸泡浓度为 200mg/L 的鱼全部在浸泡过程中死亡没有检测外, 在荧光显微镜下用紫外光观察, 浸泡浓度 30—150mg/L 各组的微耳石均被不同程度的标记。标记区在耳石中心区呈橘红色, 其外围为标记后养殖期间耳石新生长部分呈绿色。随着浸泡液浓度增高, 浸泡时间延长, 标记逐渐明显(图 1—3)。浸泡浓度 30mg/L, 浸泡时间 6—24h, 均有标记但非常微弱, 不同浸泡时间其标记强度的差异不明显; 浸泡浓度 50mg/L, 浸泡时间 6—24h, 标记较 30mg/L 明显, 但不同浸泡时间的标记强度仍没有很大差异; 浸泡浓度 100mg/L, 不同浸泡时间均可见明显的标记, 但浸泡时间 24h 的标记强度明显高于 6—12h; 浸泡浓度 150mg/L, 不同浸泡时间均可见非常明显的标记, 浸泡时间越长, 标记越醒目(表 1)。

茜素络合物对两种鱼的标记效果没有差异。此外, 当浸泡浓度超过 100mg/L 时, 用光学显微镜检测, 可看到一些微耳石和矢耳石上有一条紫红色标记带(图 4)。

表1 茜素络合物(ALC)标记结果

Tab.1 Marking result of Alizarin complexone

实验鱼 Fish	浸泡浓度(mg/L) Immersing dose	浸泡时间(h) Immersing duration	养殖时间(d) Culture time after immersing	成活率(%) Survival	标记率(%) Ratio of marking	标记效果 Marking effects
稀有鮡鲫 <i>Gobiocypris rarus</i>	30	6	10	100	100	+
		24	10	100	100	+
	50	6	10	100	100	++
		24	10	100	100	++
	100	6	10	100	100	++
		24	10	100	100	+++
	150	6	10	100	100	+++
		24	10	80	100	++++
彭泽鲫 <i>Carassius auratus pengze</i> Var.	30	6	0	0	-	-
		24	0	0	-	-
	50	12	5	100	100	+
		24	9	100	100	+
	100	12	5	100	100	++
		24	9	100	100	++
	150	12	5	100	100	+++
		24	9	100	100	+++
	200	6	5	100	100	+++
		12	5	100	100	+++
		24	9	60	100	++++
		6	0	0	-	-
	200	12	5	0	-	-
		24	9	0	-	-

-: 因实验鱼死亡而没有取样检测; +: 微弱; ++: 较明显; +++明显; ++++: 非常明显。

表2 盐酸四环素标记(CHTC)结果

Tab.2 Marking result of Chlorhydrate of tetracycline

实验鱼 Fish	浸泡浓度(mg/L) Immersing dose	浸泡时间(h) Immersing duration	养殖时间(d) Culture time after immersing	成活率(%) Survival	标记率(%) Ratio of marking	标记效果 Marking effects
彭泽鲫 <i>Carassius auratus pengze</i> Var.	50	24	5	100	100	+
	100	24	5	100	100	+
	150	12	4	100	100	++
		24	5	100	100	++
	200	12	4	100	100	++
		24	5	100	100	+++
	250	12	4	100	100	++
		24	5	100	100	+++
	300	12	4	100	100	+++
		24	5	80	100	++++
	350	24	5	50	100	++++
	400	12	4	90	100	++++
	450	12	4	0	-	-
	500	12	4	0	-	-

注: 标记效果同表1

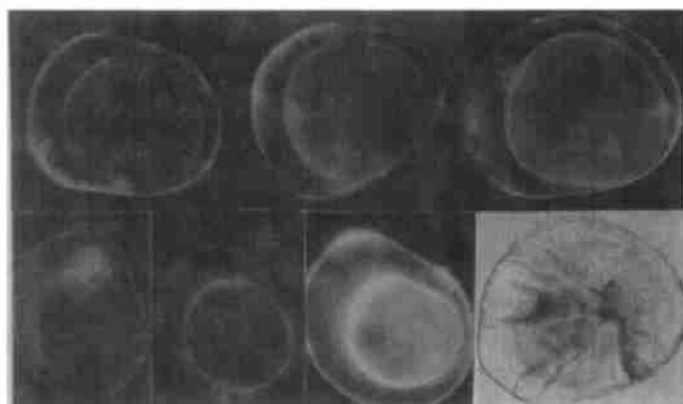


图 1-7 微耳石标记的紫外光和可见光观察

Fig.1-7 Marks on lapillus viewed under UV light and visible light

茜素络合物标记稀有鮕鲫: 1. 浸泡浓度 50mg/L, 浸泡时间 24h; 2. 浸泡浓度 100mg/L, 浸泡时间 12h; 3. 浸泡浓度 150mg/L, 浸泡时间 24h; 盐酸四环素标记彭泽鲫: 4. 浸泡浓度 250mg/L, 浸泡时间 12h; 5. 浸泡浓度 300mg/L, 浸泡时间 12h; 6. 浸泡浓度 350mg/L, 浸泡时间 24h; 7. 图 3 的可见光观察。

G. rarus immersed in Alizarin complexone (ALC): 1. 50mg/L, immersed for 24h; 2. 100mg/L, 12h; 3. 150mg/L, 24h; *Carassius auratus pengze* Var. immersed in chlorydrate of tetracycline (CHTC): 4. 250mg/L, immersed for 12h; 5. 300mg/L, 12h; 6. 350mg/L, 24h; 7. Fig.3 viewed under visible light.

2.2.2 四环素 因稀有鮕鲫在浸泡过程中均已死亡, 故只取彭泽鲫的耳石进行了标记效果的检测。在荧光显微镜下用紫外光观察, 浸泡浓度 50—400mg/L 各组的微耳石均被不同程度的标记。标记区在耳石中心区呈黄色, 其外围为标记后养殖期间耳石新生长部分呈绿色。随着浸泡液浓度增高, 浸泡时间延长, 标记逐渐明显(图 5-7)。浸泡浓度低于 100mg/L, 尽管浸泡时间长达 24h, 标记还是非常微弱, 难以辨认; 浸泡浓度 150mg/L, 标记较明显, 但浸泡 12h 和 24h 没有显著差异; 浸泡浓度在 200mg/L 以上的各实验组, 标记均较明显, 但浸泡 24h 比 12h 的标记更明显一些(表 2)。

3 讨论

3.1 关于浸泡试剂的选择

茜素络合物对两种鱼都有很好的标记效果, 且二者所需的标记条件是一样的, 合适的浸泡浓度均为 50—100mg/L, 浸泡持续 6h 以上即可取得明显可检测的标记。Tsukamoto 和 Beckman 等均报道使用茜素络合物对实验鱼没有明显致死作用, 他们用香鱼、白亚口鱼、以及小型鲤科鱼类的仔、稚鱼所做的实验还表明, 用茜素络合物溶液对这些鱼类进行浸泡能产生可检测标记的适宜浸泡浓度为 200mg/L 或以上^[5,7]。但作者的实验表明, 用茜素络合物溶液浸泡稀有鮕鲫和彭泽鲫的仔、稚鱼时, 浸泡浓度 150mg/L 即可导致鱼发生死亡, 200mg/L 则鱼全部死亡。这说明不同鱼类的种类对荧光化合物的敏感性是不一样的, 随之带来的标记效果也不一样。

盐酸四环素的价格远远低于茜素络合物, 也是被最早用来进行鱼类荧光标记的试剂。但鱼类的标记精确到日龄, 标记对象主要为仔、稚鱼后, 有许多学者指出四环素溶液浸泡

对仔、稚鱼有较大的影响^[4,5]。各个浸泡浓度组的浸泡均造成了稀有鮠鲫的全部死亡,显然不能用来对其进行标记。但盐酸四环素标记对彭泽鲫仔稚鱼的影响很小,浸泡浓度低于300mg/L,且浸泡时间在12h以内时,具有100%的存活率。用盐酸四环素标记彭泽鲫在浓度150—250mg/L的范围内,浸泡持续12h即可有效的标记。由于盐酸四环素的价格远远低于茜素络合物,显然对彭泽鲫,选择其作为浸泡液较为理想。

3.2 关于可见光标记和荧光标记的可见光观察

荧光化合物通常价格较高,并且对检测标记的设备要求也较高。因此,Beckman等提出直接用茜素红(Alizarin red S)对仔、稚鱼进行标记可能更为简捷、实用^[7]。Vigliola则报道用荧光化合物茜素络合物(200mg/L)标记三种牙鲷类稚鱼后,在可见光下也可以检测到紫红色的标记纹^[8]。用茜素络合物浸泡的仔、稚鱼耳石在普通光学显微镜下观察,发现浸泡浓度在100mg/L时,有些微耳石和矢耳石上也可检测到一条紫红色环纹。由于荧光显微镜下不能检测日轮,这种可见光的标记对于验证日轮是直接而有效的。但是,就茜素络合物而言,在可见光下,标记的检出率远远低于用荧光显微镜下观察,而且标记纹也远远不如荧光显微镜下鲜明。因此,对鱼类仔、幼鱼的大规模判标记,还是采用荧光试剂浸泡并用荧光显微镜检测较好。因Beckman的论文没有提供彩色图片,在此不能断定茜素红的可见光标记效果究竟如何,只好留待进一步的研究了。

参 考 文 献

- [1] Hettler W F. Marking otoliths by immersion of marine fish larvae in tetracycline. *Transactions of the American Fisheries Society*, 1984, **113**: 370—373
- [2] Schmitt P D. Marking growth increments in otoliths of larval and juvenile fish by immersion in tetracycline to examine the rate of increment formation. *U. S. National Marine Fisheries Service Fishery Bulletin*, 1984, **82**: 237—241
- [3] Tsukamoto K. Mass-marking of ayu eggs and larvae by tetracycline-tagging of otoliths. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 1985, **51**: 903—911
- [4] Wilson C A. Beckman D W, Dean J M. Calcein as a fluorescent marker of larval and juvenile fish. *Transactions of the American Fisheries Society*, 1987, **116**: 668—670
- [5] Tsukamoto K. Otolith tagging of ayu embryo with fluorescent substances. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1988, **54**: 1289—1295
- [6] 董双林、王志余、于信勇等. 鲤鱼仔、稚和幼鱼早期耳石上日轮的初步观察. 大连水产学院学报, 1989, **4**(1): 58—62
- [7] Beckman D W, Schulz R G. A simple method for marking fish otoliths with alizarin compounds. *Transactions of the American Fisheries Society*, 1996, **125**: 146—149
- [8] Vigliola L. Validation of daily increment formation in otoliths for three *Diplodus* species in the Mediterranean sea. *Journal of Fish Biology*, 1997, **51**: 349—360

USING FLUORESCENT SUBSTANCE TO MARK LARVAE AND JUVENILE OF *Gobiocypris rarus* AND *CARASSIUS AURATUS PENGZE* VAR

Ouyang Bin and Chang Jianbo

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

Abstract The present paper deals with methods and effects of using alizarin complexone (ALC) and chlorhydrate of tetracycline (CHTC) to mark larval and juvenile *Gobiocypris rarus* and *Carassius auratus pengze* Var. To immerse the two species in 50—100mg/L ALC solutions for 6—24h, a well-defined mark on otolith was induced. A well-defined mark on otolith was also observed when immersing larval *Carassius auratus pengze* Var in 150—250mg/L CHTC solutions for 12—24h. However, only immersing —caused mortality was observed in *G. rarus* when immersed in CHTC solution, suggesting that TC may not be suitable for being used as marking solution. Under UV light, the mark of ALC in the otoliths is a scarlet-pink fluorescent zone, and that of CHTC is a yellow fluorescent zone.

Key words Alizarin complexone, Chlorhydrate of tetracycline, Mark, Larvae and juvenile fish