

鲤(*Cyprinus carpio*)仔鱼耳石锶(Sr)标记 及其时滞特征的研究*

邱 晨¹ 姜 涛² 陈修报² 刘洪波² 杨 健^{1,2}

(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淡水渔业研究中心 院长江中下游渔业生态环境评价与资源养护重点实验室 无锡 214081)

摘要 本研究以确认鱼类早期个体规模化耳石锶(Sr)标记的可行性及其时滞特征为目的,选择鲤(*Cyprinus carpio*)仔鱼为实验对象,开展了六水氯化锶($\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)溶液 2d 的活体浸泡标记研究。结果显示,该浸泡标记过程对鲤存活、生长无显著影响。利用 X 射线电子探针微区分析(EPMA)技术分析:定量线分析结果显示对照组 Sr/Ca 比值(3.0 左右)趋于稳定,标记组却均出现了明显的标记峰值(远>3.0);面分布分析结果表明在标记组鲤耳石上均呈现出一圈明显、清晰可见的红色“高 Sr 标记环”。此外,对比对照组和标记组微化学结果发现,“高 Sr 标记环”在恢复续养 250d 后的鲤耳石仍然可见,说明 Sr 标记可长期存在。观察鲤仔鱼耳石微结构,发现 Sr 在耳石上存在明显的时滞效应。首次得出在开始浸泡后的第 3 天,耳石上才开始出现 Sr 标记,在浸泡结束后的第 6 天,耳石 Sr 标记区才会完全消失的结论。本研究首次揭示出,外源 Sr 标记的方法在鲤仔鱼种群大规模增殖放流标记和评价中将具有很强的稳定性、可靠性、可行性和应用潜力。

关键词 鲤;耳石;锶标记;增殖放流;X 射线电子探针微区分析

中图分类号 S917.4 doi: 10.11693/hyhz20190100003

增殖放流活动是一项以恢复水生物资源、修复水域生态环境、促进渔民增收为目的的科学性工作(杨君兴等, 2013)。近几年来,农业部和各级政府都非常重视这项工作,为落实《中华人民共和国渔业法》、《中国水生生物资源养护行动纲要》和《关于做好“十三五”水生生物增殖放流工作的指导意见》等相关精神,每年都开展了大规模的增殖放流活动。值得注意的是,标记放流技术是帮助人们获得人工向公共水域(海洋、江河、湖泊等)增殖放流后鱼类种群信息的重要手段之一。为了更好地保护和合理利用渔业资源,开发及优化更客观的、更有效的评价增殖放流效果的标记放流方法成为了需要迫切解决的技术难题。

目前,适用于规模化群体标记鱼类早期个体的

的方法主要有体外标记、化学标记和分子标记等方法(周辉霞等, 2017)。体外标记(如挂牌、切鳍标记等)等方法虽操作简捷、不需要专门的检测装置,但存在易对鱼体造成机械性损伤、劳动强度大、标记易遗失等不足,且很难用于鱼苗的大规模群体标记(张堂林等, 2003; 张雪等, 2013);有机荧光物质等化学标记可能涉及标记的有效保留时间和外源物质的安全性问题(耿倩等, 2016);分子标记(如微卫星标记等)随相关技术的发展,虽已可做到准确安全,识别简单,成本也在降低,但对鱼苗繁殖中的亲本群体的背景、遗传档案等有很高的要求,在一定程度上限制了其应用,且尚处于研究阶段(宋娜等, 2010)。因而,继续针对不同的放流种类和评价目的来探寻合适的标记技术仍具有非常重要的意义。

* 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项, 2019JBFM06 号; 农业财政专项, CJDC-2017-22 号。邱 晨, 硕士研究生, E-mail: 657465328@qq.com

通信作者: 杨 健, 博士生导师, 研究员, E-mail: jiany@ffrc.cn

收稿日期: 2019-01-03, 收修改稿日期: 2019-03-03

增殖放流鱼类(特别是苗种)的规模化标记问题长期是水生生物增殖放流关键技术研究领域的一大难点。研究表明,耳石微量元素(如锶(Sr))作为一种天然的化学标记工具被开发出来,具有保留时间长、易识别、成本低、标记后鱼体存活率高等优点,且具单次可大规模标记受精卵、仔稚鱼的潜力(Warren-Myers *et al.*, 2018)。Sr 在淡水中含量很低,而海水中的 Sr 浓度是淡水中的近 100 倍(Limburg, 1995),已被作为有效客观重建鱼类经历过淡水、海水等不同自然生境的一种“元素指纹”(Melancon *et al.*, 2009; Collingsworth *et al.*, 2010; 窦硕增等, 2011; 刘洪波等, 2018)。迄今,耳石 Sr 标记技术在国内外已成为了研究热点之一。在鲑鱼苗(Schroder *et al.*, 1995)、鳗鱼幼鱼(Wickström *et al.*, 2014)、大麻哈鱼(*Oncorhynchus keta*)胚胎(王臣, 2015; 王臣等, 2015)、大黄鱼(*Larimichthys crocea*)幼鱼(张辉等, 2015)、鳙(*Aristichthys nobilis*)1 龄鱼(李秀启等, 2017)、黑鲟(*Spuars macrocephalus*)幼鱼(张翼等, 2018)、褐牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)幼鱼(李爽等, 2018)等鱼类上均有报道。

鲤(*Cyprinus carpio*)是我国代表性的淡水经济鱼类(封功能等, 2011)。为初步探索早期个体大规模耳石 Sr 标记技术的可行性,本研究拟尝试在养殖水环境中人工添加一定量的外源 Sr 对鲤仔鱼耳石进行浸泡标记,以使其耳石上能产生相应的 Sr 标记区,探索鲤仔鱼耳石 Sr 标记效果,并经过长时间续养恢复验证 Sr 标记在耳石上存在的稳定性、可靠性、长久性,以期初步归纳出适用于鱼类耳石微化学标记技术的实验条件,为今后研究鱼类其他硬组织(鳍条、鳞片)标记及其他鱼类早期生活史个体的增殖放流中应用该技术提供理论和技术支撑。并首次对耳石微结构进行观察以期进一步了解 Sr 标记在耳石上沉积的时滞效应,为准确预测鱼类环境特征提供相关的理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究在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开展。实验用鱼为上述基地人工繁育的健康福瑞鲤(FFRC strain common carp, *Cyprinus carpio*)个体,采于 2017 年 4 月 26 日,尚属仔鱼(14 日龄)阶段(曹文宣等, 2007)。本研究用的六水氯化锶($\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)化合物(分析纯)购自上海抚生实业有限公司。

1.2 锶化合物浸泡标记方法

随机挑选 300 尾鱼作为标记组,500 尾实验鱼作为对照组,初始全长为 8—10mm。实验前,鱼在装有曝气水的 100cm×45cm×50cm(长×宽×高)玻璃缸中暂养 1d,不喂食。

配置 10mg/L $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sr^{2+} 理论浓度 3.3mg/L)水溶液进行 2d 的鱼浸泡标记实验,标记组的溶液浓度经电感耦合等离子质谱仪(ICP MS)测定 Sr^{2+} 浓度为 3.6mg/L(与预期 Sr^{2+} 的理论浓度相似),而对照组的养殖用水中的 Sr^{2+} 背景含量很低,为 0.24mg/L(表 1)。浸泡标记期间,分别统计对照组和标记组的个体急性死亡情况,并及时清除死鱼,不断向实验水体充氧,不喂食。

浸泡标记 2d 后,将对照组和标记组鱼分别置于一个同上规格、盛有 100L 曝气自来水的玻璃缸中续养恢复。期间投喂蛋黄水和碾磨成粉状的普通配合饲料,每日清理鱼排泄物及换水 1 次,换水量占养殖水体的 25%。在此过程中进行取样,(1)了解不同续养恢复天数 Sr 标记效果定期取样:对照组和标记组每隔 5d 定期取样,持续至 30d,每次随机选取 5 尾。续养恢复 30d 之后,还分别进行了续养恢复第 35、50、140 天的 5 尾实验鱼的取样。(2)探索长时间续养恢复 Sr 标记效果:续养 140d 之后,仅进行续养而停止取样,待续养恢复 250d 时取样。测量鱼体重和全长(分别精确到 0.01g 和 0.001mm),保存于 100%无水乙醇中。整个实验期间水温在 18—24°C 之间,不控光周期。

1.3 耳石的摘取与检测方法

硬骨鱼类有三类耳石,即矢耳石、星耳石和微耳石(图 1)。从耳石样本的采取和加工及三对耳石的荧光标记效果(邱晨等, 2018)来看,本研究以星耳石作为三对耳石的代表来进行相关分析。星耳石先用去离子水清除耳石表面的杂质,脱水、干燥备用,用环氧树脂(Epofix, 丹麦 Struers 公司)进行包埋,再使用 500 目砂纸和 1200 目砂纸打磨至核心可见为止,配合抛光液用磨抛机(LaboPol-35, 丹麦 Struers 公司)将其抛光至核心完全暴露在表面且耳石表面无明显划痕。样品放入去离子水中超声清洗 5min 后,再用 Millo-Q 水冲洗 12 遍,完全干燥后,用真空镀膜机(JEE-420, 日本电子株式会社)镀膜(36A, 25s)。参考 Yang 等(2006)、杨健等(2010)的分析方法,利用 X 射线电子探针微区分析仪(EPMA, 简称电子探针, JXA-8100 型, 日本电子株式会社, 下同)对耳石进行定量线和面分布(含量用 16 色棒图谱表示)分析。

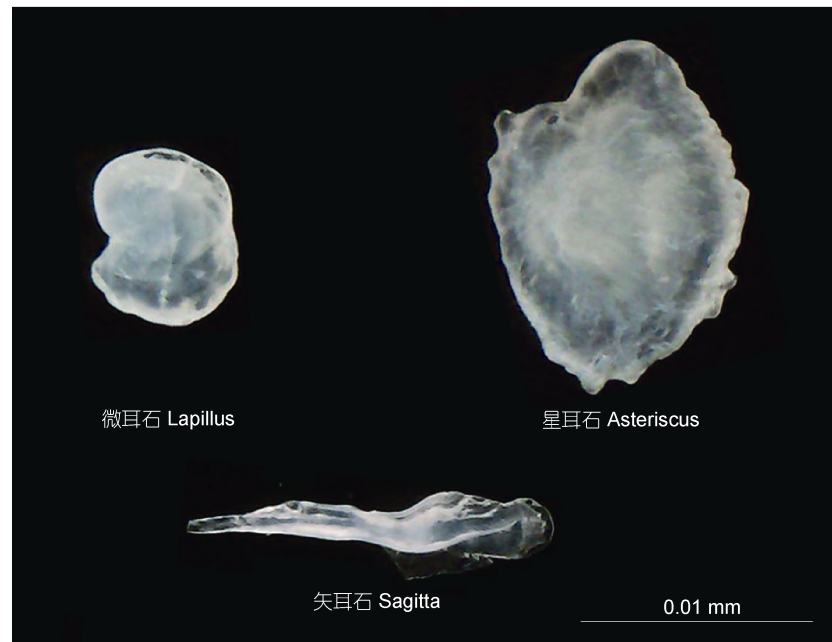


图 1 鲤鱼三类耳石(微耳石, 星耳石, 矢耳石)

Fig.1 Three types of otoliths in larvae *C. carpio* (Lapillus, Asteriscus, Sagitta)

1.4 数据处理

本研究中数据采用 Excel 2007 进行汇总及作图。耳石上不同区域 Sr/Ca 比值用平均值±标准差表示, 采用 SPSS 19.0 的单因素方差分析进行不同续养恢复时间下实验组与对照组的 Sr/Ca 比差异显著性分析, 设定差异显著性水平 P 为 0.05, 当 $P < 0.05$ 时为差异显著。由于耳石中 Sr 含量远小于 Ca 含量, 按惯例 Sr/Ca 指经过标准化的比值, 即 $(\text{Sr}/\text{Ca}) \times 10^3$ 。

2 结果

2.1 锶浸泡处理对鲤仔鱼生存及生长的影响

2.1.1 锶浸泡处理对鲤仔鱼生存的影响 在 2d 的浸泡标记期间, 对照组($N=500$)和标记组($N=300$)死亡数分别为 2 尾和 1 尾(表 1), 两组死亡情况相差不大且死亡率很小, 标记组中鲤活动行为与对照组无明显区别, 游动和摄食正常, 说明在高 Sr 溶液的水环境中鲤仔鱼的应激性死亡无影响。长达 250d 的续养

恢复期间, 对照组死亡数为 245 尾, 标记组为 158 尾(表 1), 两组死亡率相近, 活动行为及摄食等与对照组也无明显区别, 说明 Sr 标记处理并不会对本实验中鲤仔鱼养殖造成额外的影响。

2.1.2 锶浸泡处理对鲤仔鱼生长的影响 经过一段时间的恢复续养, 鲤仔鱼对对照组和标记组的全长和体重均增加(表 2), 经差异性检验, 对照组与标记组在续养恢复 0—30d 的养殖过程中平均全长及平均体重及相互之间的关系均无显著差异($P > 0.05$), 可见 Sr 标记处理后对鲤仔鱼的生长也不会带来额外的影响。

2.2 外源锶在鲤仔鱼耳石上的面分布特征

从本研究的面分布结果可以看出: (1) 标记效果好, 标记率高: 鲤仔鱼在添加外源 Sr 水环境中标记浸泡 2d 后, 标记组所有个体星耳石核心区及其边缘均为 Sr 含量较低的蓝色区, 但在耳石边缘可见极为明显的高 Sr 含量的红色区, 表现为“高 Sr 标记环”,

表 1 鲤仔鱼六水氯化锶浸泡标记和续养恢复期间的死亡数

Tab.1 Number of deaths of larvae *C. carpio* immersed in $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ during the immersion and recovery

组别	$\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 浓度(mg/L)	Sr^{2+} 实际浓度(mg/L)	总样本数(n)	死亡数(n)	
				浸泡标记期间	续养恢复期间
对照组	0	0.24	500	2	245
标记组	10	3.61	300	1	158

表 2 六水氯化锶标记浸泡对鲤仔鱼平均体重和平均全长的影响
Tab.2 Effects of immersion in $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ on the mean body weight and the mean total length of larval *C. carpio*

续养恢复天数(d)	取样数(n)	平均全长(mm)		平均体重(g)	
		对照组	标记组	对照组	标记组
5	5	9.90±0.81	10.90±0.86	0.008±0.001	0.012±0.004
10	5	10.65±0.64	10.55±0.70	0.010±0.001	0.010±0.003
15	5	11.56±1.00	11.40±1.32	0.012±0.003	0.014±0.007
20	5	11.46±0.55	11.38±0.94	0.010±0.002	0.014±0.004
25	5	12.47±1.08	11.96±0.57	0.010±0.006	0.018±0.014
30	5	13.40±0.77	13.64±2.64	0.034±0.005	0.016±0.040

标记率为 100%，而对照组个体耳石边缘均无变化，整个耳石表现为较为单一的低 Sr 含量的蓝色区(图 2)。(2) Sr 标记存在时间长久：经 2d 浸泡标记处理后的标记组鲤仔鱼在自然养殖水环境中续养

恢复 5d 直至 250d 的期间内，耳石上“高 Sr 标记环”均极为明显(图 3)，未表现减退或消失的趋势，说明 Sr 标记在鲤耳石上至少能存在 250d，甚至更久。

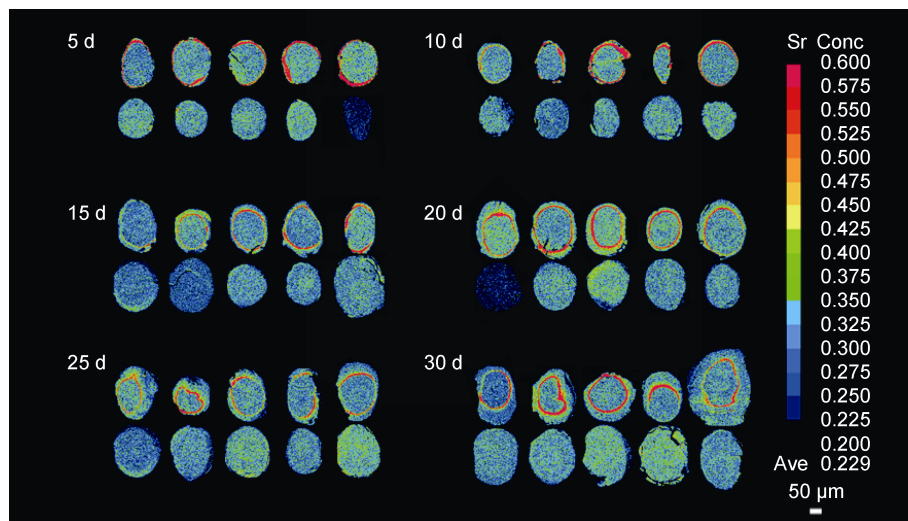


图 2 不同续养恢复时间的标记组(上)和对照组(下)鲤仔鱼耳石锶含量面分布图谱

Fig.2 The Sr marking in otoliths of the marking group (upper) and control group (lower) of larval *C. carpio* under different days of recovery after being immersed in $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

注: 16 色棒(从黑到红)表示 Sr 含量从低到高

2.3 外源锶在鲤仔鱼耳石上线分析的 Sr/Ca 比变化特征

对照组耳石从核心到边缘(最长轴半径, 下同)Sr/Ca 比值(均在 3.0 左右)变化幅度小且稳定, Sr/Ca 比值分别为 3.06 ± 0.29 (图 4)。但各标记组在距核心 66—131 μm 处, Sr/Ca 比值变化都比较稳定(对应耳石核心中央蓝色同心圆区域), 3.26 ± 0.06 , 与对照组不存在显著差异($P > 0.05$); 距核心 66—161 μm 处 Sr/Ca 比值开始明显升高, 均出现 1 个明显的相对平稳的峰(对应黄绿色和红色同心圆区域), Sr/Ca 比值为 15.46 ± 1.96 (远 >3.0), 是标记前的 4.74 倍, 与标记前相比, 差异显著($P < 0.05$), 该高 Sr 区域即 Sr 标记区;

随后在距核心 70—202 μm 处 Sr/Ca 比值逐渐下降, 恢复到和标记前及对照组类似的正常水平且趋于稳定(对应耳石边缘蓝色同心圆区域), Sr/Ca 比值为 3.15 ± 0.10 , 与对照组及标记前不存在显著差异($P > 0.05$)(图 2, 图 4)。

2.4 鲤仔鱼耳石上锶标记的时滞效应

外源 Sr 浸泡标记鲤仔鱼 2d 后, 在其耳石上出现了 Sr 沉积, 且可发现 Sr 的沉积过程与鱼体 Sr 溶液浸泡时间并不一致, 在浸泡结束后, Sr 仍能持续向耳石上沉积一段时间, 耳石上 Sr 标记的形成和完成时间与鱼体 Sr 浸泡开始和结束的时间存在一定时间差(即时滞)(图 5)。

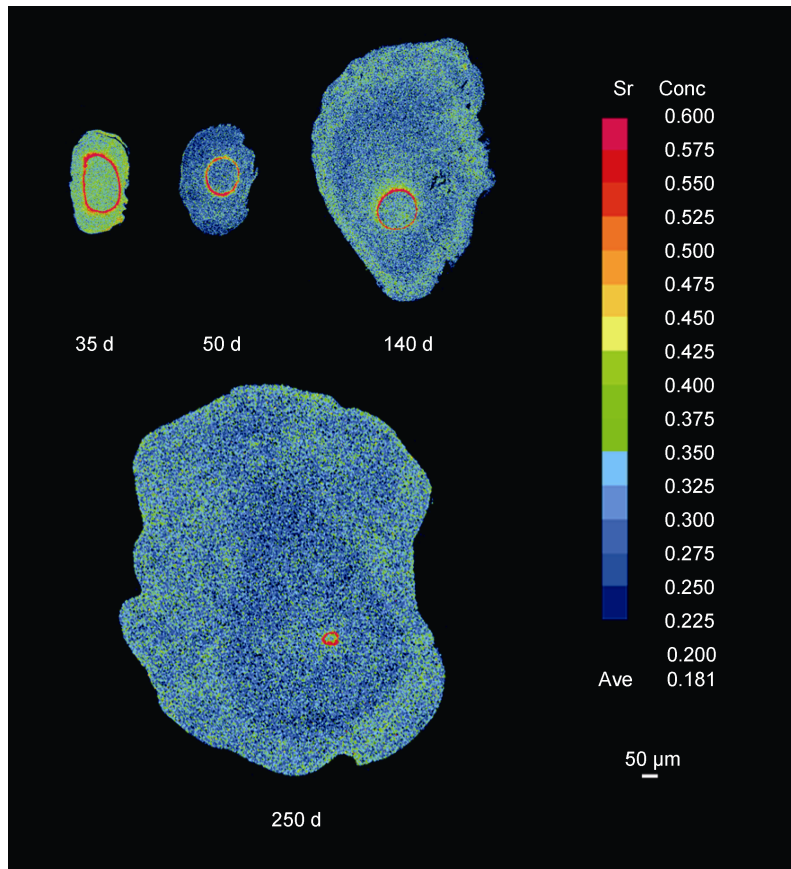


图 3 续养恢复 35—250d 鲤耳石上的锶标记图谱

Fig.3 The Sr marking in otoliths of larval *C. carpio* recovered 35—250 days after being immersed in $SrCl_2 \cdot 6H_2O$

注: 16 色棒(从黑到红)表示 Sr 含量从低到高

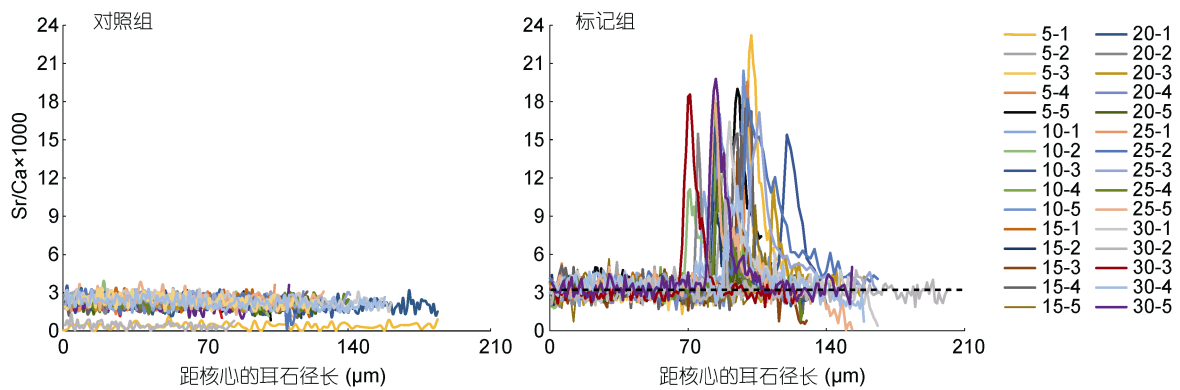


图 4 鲤仔鱼耳石从核心(0μm)到边缘定量线分析所获 Sr/Ca 比值图谱

Fig.4 The Sr/Ca ratios along line transects from the core (0μm) to edge of otoliths of larval *C. carpio*

注: 虚线表示成功标记基线, 数值是对照组 Sr/Ca 比值, 为 3.06

由于鲤耳石上的生长轮具有日沉积规律, 可以准确定时, 且董双林等(1989)研究指出其第一个生长轮通常出现在孵化后的 24h 之内, 故耳石上读取的轮纹数应该与鱼的实际日龄相同。本研究是在添加外源 Sr 的水环境中对 14 日龄的鲤仔鱼进行 2d(15—16 日

龄为浸泡时间)的浸泡处理, 通过鲤仔鱼耳石上微化学图谱可以发现, Sr 在耳石上开始标记时间是在第 18 日龄(靠近核心的红色同心圆)(箭头显示 Sr 沉积时间为第 17 日龄形成结束时), 在第 19 日龄时标记结束(靠近耳石边缘的红色同心圆), 说明标记轮为 2 轮;

在第 20、21、22 日龄上存在高 Sr 拖尾现象(黄绿色同心圆区域), 第 23 日龄开始 Sr/Ca 比值才能恢复到与鱼体浸染标记前类似的正常值(耳石边缘的蓝色同心圆区域)(图 5), Sr 标记持续了 5d。这一现象说明 Sr 标记开始标记的时间与开始浸泡的时间存在 3d 的时滞, 而 Sr 标记完成的时间与浸泡结束的时间存在 6d 的时滞。

基于上述时滞结果, 笔者建议为获得有效、完整的鲤耳石“高 Sr 标记环”图谱, 至少应该在鱼体 Sr 浸泡结束并恢复续养后的第 2 天后才可采集耳石标本用于电子探针微化学分析。

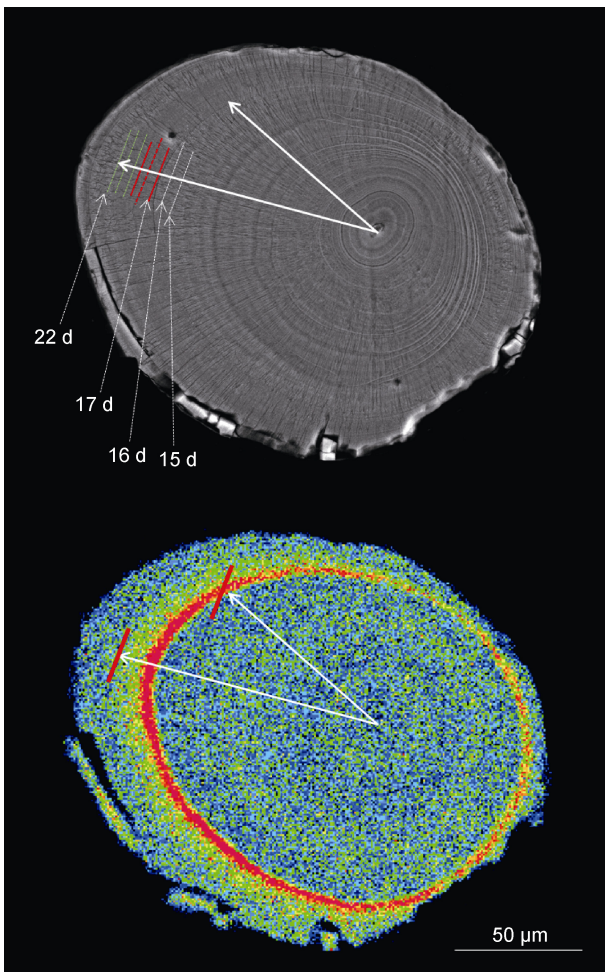


图 5 鲤仔鱼星耳石中锶标记形成和完成时滞的推算

Fig.5 Retroactive calculation of possible time lag for the occurrence and disappearance of Sr marking in asteriscus of larval *C. carpio*

注: 图中白色直线箭头表示由耳石核心指向荧光标记轮边缘, 15, 16, 17, 22d 指示第 15, 16, 17, 22 日龄形成结束时; 上图图中白色线即 15—16d 表示浸泡标记时间, 红色和黄绿色线即 17—22d 表示“Sr 标记区”

3 讨论

3.1 耳石锶标记在鲤鱼放流标记上的安全性和可靠性

Sr 存在于自然水域中, 也是生物必需的微量元素之一, 急性毒性风险较小(陈德敏等, 2003; 李峰等, 2006; 蔺艳等, 2012, 2013a, b, c; 任艳丽等, 2018), 对生物的生长发育有着促进作用或者抑制作用(蔺艳等, 2012, 2013b, c; 宋洪建, 2013)。宋洪建(2013)研究表明当 Sr 浓度为 10mg/L 时, 大麻哈鱼(*Oncorhynchus keta*)稚鱼的各项生长指标均最高, 但随着 Sr 浓度的增加, 各项生长指标均逐渐降低, 较高的 Sr 浓度还可能对其生长有抑制作用。可想而知, 每种生物对 Sr 浓度需求都有一个最适范围, 过高或过低都有可能不利于其生长。因此, 在实际运用“浸泡式”耳石 Sr 标记技术时, 首先应考虑其标记物及标记物浓度的安全性。迄今, 耳石 Sr 标记技术对鱼类的生长、发育和生理方面的影响尚不得而知, 值得探讨。本研究结果显示, 在标记处理过程中标记鱼死亡率、全长和体重及游泳摄食等方面与对照组无显著差异, 反映了在 10mg/L SrCl₂·6H₂O 的高 Sr 养殖水环境中短期浸泡对鲤仔鱼的生存和生长状况无额外影响。Ophel 等(1968)利用 Sr 标记金鱼及 Yamada 等(1979)用 Sr 标记鲑鱼的研究结果同样表明了, Sr 并没有对鱼体产生有害的影响。另外, 本研究在养殖水中添加 3.6mg/L 的 Sr²⁺ 不超过国家饮用水 Sr 浓度标准(Sr²⁺ 浓度大于 0.2mg/L 为 Sr 矿泉水, 其限量指标为小于 5mg/L)。因此, 本研究选定的 10mg/L Sr 浸泡标记浓度对标记鱼及水环境应该具有安全性。而且本研究线分布结果显示出在自然水域中经过 15d 以上的续养恢复, 其耳石上的 Sr/Ca 比值已逐渐恢复到了标记前的正常水平, 说明在将经过 15d 或以上的恢复续养标记鱼放流到江河、湖泊等中, 可以排除经短时间高 Sr 浸泡过的标记鱼污染放流水域的可能性。而关于 Sr 在标记鱼体内的残留问题, 将在以后的研究内容中进一步探讨。

Kennedy 等(2000)研究表明外源 Sr 是一种有效的标记途径, 本研究结果表明耳石 Sr 标记技术对于鱼类早期个规模化放流标记具有较强的可行性。鲤仔鱼浸泡于高 Sr 溶液中 2d 后, 可以在耳石上产生了极易识别的红色“高 Sr 标记环”, 参考前期同类研究(张辉等, 2015), 得到标记率为 100% 的结论。不仅如此, 在操作过程中简捷方便、劳动力小、成本低, 具有适于鲤大规模资源群体放流标记的潜力, 这与前人在其

他鱼类上所得出的研究趋势相一致(Yamada *et al.*, 1987; Schroder *et al.*, 1995; 王臣, 2015; 王臣等, 2015; 张辉等, 2015; 李秀启等, 2017)。虽然很多研究已证实耳石 Sr 标记技术的可行性, 但在众多研究及实际运用中, 很多人都质疑耳石 Sr 标记存在时间的长短及标记是否会消失(退)的问题。Ophel 等(1968)认为该途径可永久性地标记鱼, Schroder 等(1995)利用 Sr 溶液标记鲑苗时, 也指出 Sr 标记能长期存在, Yamada 等(1987)更发现外源 Sr 水体浸泡标记大麻哈鱼苗后, 续养 169d 后仍能检测到耳石上的 Sr 标记区。这是因为 Sr 通过结晶作用从水体中进入鱼内耳淋巴液, 沉积在耳石中(罗军燕等, 2008), 由于耳石的非细胞性和代谢惰性, 随着鱼类及其耳石的同步生长, 其组成成分不会随时间推移而发生改变(Campana, 1999), 进而产生永久性可识别的“Sr 标记环”。在目前为止, 国内已报道的鱼类耳石 Sr 标记最长的存在时间是 120d(王臣等, 2015), 本研究结果显示甚至在经过长达 250d 的续养恢复后, 鱼耳石上的“高 Sr 标记环”依然清晰存在, 这说明 Sr 标记在鲤仔鱼耳石上可长久地存在, 具有稳定性、持久性及可靠性。

3.2 X 射线电子探针微区分析技术检测锶标记的优势

为客观有效地评价增殖放流效果, 规范、便捷和可行的大规模标记技术是必不可少的, 但客观而直观的标记检测方法也尤为重要。本研究利用 X 射线电子探针微区分析技术来检测 Sr“浸泡式”鲤耳石 Sr 标记图谱的存在, 显示出了灵敏度高、快速且对样品无损坏的特点, 同时得到了准确度高的定量线分析和直观的面分析图像, 而两者的结合说明, 可更准确直观显示耳石锶标记的效果, 这些优势在前人大麻哈鱼、鳙的类似研究上同样得到了体现(王臣等, 2015; 李秀启, 2017; 李爽等, 2018)。

X 射线电子探针微区分析技术作为一种有效测定固相微区元素成分的技术, 具有能提供高分辨率图谱及微米级精确、定量性的数据、分析过程快速且不损坏样品等一系列优势, 故广泛地应用于冶金、地质、电子材料、生物、医学、考古等领域, 是矿物等固相材料微化学分析的重要工具(内山郁等, 1982; 李斌之, 2011)。近年来, 随着鱼类耳石的生态学意义被不断发掘, 耳石微化学的潜在应用价值在国内外引起了广泛的兴趣极大关注, 电子探针技术也被引入了耳石微化学领域, 并解决了很多常规手段难以解决的鱼类生态学问题, 取得了众多研究成果: 李孟孟等(2017)确定了长江安庆江段所获刀鲚均为典型的溯

河洄游个体; 卢明杰等(2015)发现了大辽河口红狼牙鰕虎鱼(*Odontamblyopus rubicundus*)孵化和早期生活史生境的多样化及对不同盐度水体环境的高度适应性; 熊瑛等(2015)掌握了黄海南部银鲳和鲆鱼生境利用的种间差异性; Khumbanyiwa 等(2018)重建了钱塘江野生刀鲚的生活史及生境“履历”; 窦硕增等(2011)研究了长江口水域四种鱼类(刀鲚 *Coilia nasus*、凤鲚 *C. mystus*、带鱼 *Trichiurus haumela* 及长吻鮠 *Leiocassis iongirostris*)的生活履历及生活史型。

3.3 鲤仔鱼耳石锶标记出现及完成的时滞性

不同自然水体中 Sr 的含量与分布方式通常存在显著差异(淡水区含量低、河口半咸水区中、海水区高)(Zlokovitz *et al.*, 2003), 在耳石上 Sr 的沉积含量可反映这种差异, 故耳石中不同 Sr 含量水平可作为反演鱼类生活史所经历的不同盐度水环境过程的有效指标。环境元素和生理条件对耳石中 Sr 摄取和沉积的影响机制尚未完全弄清。总体来看, 耳石上 Sr 的沉积是一个生理动态过程, 与水温或水体中的特定物质浓度密切相关(Radtke *et al.*, 1992)。研究表明, 在元素沉积过程中, 由于同一族的 Sr 和 Ca 具有相似的化学性质, CaCO_3 在耳石上沉积的过程中, Sr 可通过类质同象置换 Ca 离子或晶格间隙占位及蛋白质分子多肽链相结合等途径沉积在耳石上(Campana, 1999; Campana *et al.*, 2001)。但 Sr 从水环境到耳石的元素通道是一个多阶段的过程, 涉及复杂的离子、蛋白之间的相互作用和多种生理屏障。元素需要经过一定的时间来通过这些屏障, 然后才能在耳石上沉积(Elsdon *et al.*, 2003)。Yokouchi 等(2011)的研究表明, 鳃幼鱼耳石中的耳石中的基本成分与水体环境完全平衡所需的时间可能达 30—60d。王臣等(2015)发现, 大麻哈鱼发眼卵后期胚胎从 Sr 开始浸泡到 Sr 在耳石上沉积有延时现象, 浸泡时间仅为 2d, 但 Sr 峰值却持续 12d 以上, 表明 Sr 在“养殖水 - 实验鱼 - 耳石”系统的迁移、沉积过程是渐进的。在鳃幼鱼(李秀启等, 2017)、布氏棘鲷(*Acanthopagrus butcheri*)幼鱼(Elsdon, 2005)等耳石上也存在一样的时滞效应。本研究结果显示, 水体环境中的外源 Sr 沉积鲤仔鱼耳石上并不会立即响应, 耳石 Sr 峰值的出现和消失均有明显滞后(即时滞)效应。本研究在前人对时滞的认识的基础上, 通过对 14 日龄的鲤耳石微结构的观察进一步直接确认了从鱼 Sr 溶液浸泡到耳石 Sr 标记开始形成存在 3d 的时滞, 而从 Sr 溶液浸泡结束到耳石 Sr 标记消失则存在 6d 的时滞。标记鱼在外源 Sr 溶液中浸泡标记了 2d,

Sr 标记却在耳石上持续了 5d。

结合前人及本研究可以发现,不同生长阶段的不同鱼种在不同的水域环境种的时滞效应是不同的,这种时滞特征机制可能需从不同鱼种的 Sr 的沉积机制和耳石结构等方面开展进一步研究(罗军燕等, 2008; Ren *et al.*, 2013)。除了水环境的基本因素,如盐度(Tzeng, 1996; Panfili *et al.*, 2015)、温度(Tzeng, 1994)等,鱼类遗传、发育阶段、生长速率、食物和生理条件等生物因素也可能影响 Sr 沉积在耳石的时滞时间(Sturrock *et al.*, 2014, 2015)。因此,更好地把握 Sr 在不同增殖放流鱼种间耳石上沉积时滞效应特征,将会更有助于客观评价耳石锶标记的效果并制定相应的规范。

4 结论

本研究以经济鱼类的代表性鱼类鲤为对象,通过对其仔鱼的外源 Sr 浸泡,检验了耳石 Sr 标记的效果。X 射线电子探针微区分析技术确认了耳石上的 Sr 标记效果十分理想,标记成功率为 100%。Sr 标记区甚至可在耳石上保留 250d。这显示出了该标记方法在鲤仔鱼的大规模放流标记上具有稳定性、可靠性和可行性。本研究还通过耳石的微结构掌握了鲤仔鱼耳石 Sr 沉积的动态特征,发现 Sr 浸泡鱼体与其沉积到耳石上存在时滞效应。鲤仔鱼 Sr 浸泡开始、结束时间与耳石 Sr 标记出现、消失时间上分别有 3d 和 6d 的时滞。下一步笔者将设置不同梯度的 Sr 浓度、浸泡标记时间对不同规格鲤及其他经济鱼类的硬组织(耳石、鳍条、鳞片等)来开展更系统的研究,探寻最佳或最基本的标记条件及非致死的研究途径,以便为其他名贵鱼类增殖放流效果评价及制定相关的微化学标记技术规范 and 标准提供更好的理论和技术支撑。

参 考 文 献

- 王 臣, 2015. 基于大麻哈鱼耳石的化学标记及其应用研究. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文
- 王 臣, 刘 伟, 战培荣等, 2015. 外源 Sr^{2+} 在大麻哈鱼胚胎耳石上的沉积. 应用生态学报, 26(10): 3189—3194
- 卢明杰, 刘洪波, 姜 涛等, 2015. 大辽河口红狼牙鰕虎鱼耳石微化学的初步研究. 海洋渔业, 37(4): 310—317
- 任艳丽, 王建林, 2018. 锶的生物学效应研究进展. 北京联合大学学报, 32(1): 44—49
- 刘洪波, 姜 涛, 邱 晨等, 2018. 长江口水域四种鱼类的耳石微化学研究. 海洋与湖沼, 49(6): 1358—1364
- 李 峰, 刘 斌, 赵信义等, 2006. 含锶磷酸钙骨水泥的细胞毒性. 中国现代医学杂志, 16(20): 3080—3082
- 李 爽, 李 耕, 潘玉洲等, 2018. 褐牙鲈幼鱼耳石上的外源 Sr 标记试验. 江苏农业科学, 46(12): 140—143
- 李秀启, 丛旭日, 师吉华等, 2017. 耳石锶标记在识别鳙 (*Aristichthys nobilis*) 放流个体的可行性. 湖泊科学, 29(4): 914—922
- 李孟孟, 姜 涛, 陈婷婷等, 2017. 长江安庆江段刀鲚耳石微化学及洄游生态学意义. 生态学报, 37(8): 2788—2795
- 李斌之, 2011. 微区分析技术电子探针的原理应用与溯源. 计量与测试技术, 38(3): 26—28
- 杨 健, 刘洪波, 2010. 长江口崇明水域鳊鱼耳石元素微化学分析. 中国水产科学, 17(4): 853—858
- 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
- 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
- 宋 娜, 高天翔, 韩 刚等, 2010. 分子标记在渔业资源增殖放流中的应用. 中国渔业经济, 3(28): 111—117
- 宋洪建, 2013. 大麻哈鱼仔鱼异速生长和锶对其稚鱼生理指标的影响. 哈尔滨: 东北农业大学硕士学位论文
- 张 雪, 郭艳娜, 张虎成, 2013. 水电站鱼类人工增殖放流标记方法研究概述. 环境科学与管理, 38(12): 127—130
- 张 辉, 姜亚洲, 袁兴伟等, 2015. 大黄鱼耳石锶标志技术. 中国水产科学, 22(6): 1270—1277
- 张 翼, 姜亚洲, 徐开达等, 2018. 锶元素对黑鲟幼鱼耳石的标记效果分析. 海洋渔业, 40(2): 171—178
- 张堂林, 李钟杰, 舒少武, 2003. 鱼类标志技术的研究进展. 中国水产科学, 10(3): 246—253
- 陈敏德, 傅远飞, 2003. 不同含锶量的掺锶磷酸钙陶瓷细胞毒性评价. 现代口腔医学杂志, 17(6): 501—503
- 罗军燕, 李胜荣, 申俊峰, 2008. 鱼耳石中锶和钡富集的影响因素及其环境响应. 地学前缘, 15(6): 18—24
- 周辉霞, 甘维熊, 2017. 鱼类标记技术研究进展及在人工增殖放流中的应用. 湖北农业科学, 56(7): 1206—1210
- 封功能, 杨文平, 王爱民等, 2011. 饥饿胁迫对鲤形体、体成分及血液生理指标的影响. 上海海洋大学学报, 20(6): 814—819
- 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
- 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, 169—170
- 董双林, 王志余, 于信勇等, 1989. 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, 4(1): 58—62
- 窦硕增, 横内一树, 于 鑫等, 2011. 基于 EPMA 的耳石 Sr:Ca 比分析及其在鱼类生活履历反演中的应用实例研究. 海洋与湖沼, 42(4): 512—520
- 蔺 艳, 张莹茜, 盘强文等, 2013a. 高锶矿泉水的细胞毒性研究. 广东医学, 34(14): 2125—2128
- 蔺 艳, 张莹茜, 盘强文等, 2013b. 锶矿泉水对人血管内皮细胞的增殖和功能的影响. 中国食品卫生杂志, 25(2): 136—139
- 蔺 艳, 盘强文, 冯志强等, 2012. 锶矿泉水对人肾小管上皮细胞增殖及 ATP 酶活性的影响. 中国组织工程研究, 16(15): 2801—2804
- 蔺 艳, 盘强文, 冯志强等, 2013c. 不同浓度的高锶矿泉水对人肝细胞增殖及功能的影响. 泸州医学院学报, 36(1): 23—26

- 熊 瑛, 刘洪波, 姜 涛等, 2015. 黄海南部野生银鲈和鲈鱼的耳石元素微化学研究. 海洋学报, 37(2): 36—43
- 内山郁, 渡边融, 纪本静雄编著, 刘济民译, 1982. 电子探针 X 射线显微分析仪. 北京: 国防工业出版社
- Campana S E, 1999. Chemistry and composition of fish otoliths: pathways, mechanisms and applications. Marine Ecology Progress Series, 188: 263—297
- Campana S E, Thorrold S R, 2001. Otoliths, increments, and elements: keys to a comprehensive understanding of fish populations? Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 58(1): 30—38
- Collingsworth P D, van Tassell J J, Olesik J W *et al*, 2010. Effects of temperature and elemental concentration on the chemical composition of juvenile yellow perch (*Perca flavescens*) otoliths. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 67(7): 1187—1196
- Elsdon T S, 2005. Strontium incorporation into calcified structures: separating the effects of ambient water concentration and exposure time. Marine Ecology Progress Series, 285: 233—243
- Elsdon T S, Gillanders B M, 2003. Reconstructing migratory patterns of fish based on environmental influences on otolith chemistry. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 13(3): 217—235
- Kennedy B P, Blum J D, Folt C L *et al*, 2000. Using natural strontium isotopic signatures as fish markers: methodology and application. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 57(11): 2280—2292
- Khumbanyiwa D D, Li M M, Jiang T *et al*, 2018. Unraveling habitat use of *Coilia nasus* from Qiantang River of China by otolith microchemistry. Regional Studies in Marine Science, 18: 122—128
- Limburg K E, 1995. Otolith strontium traces environmental history of subyearling American shad *Alosa sapidissima*. Marine Ecology Progress Series, 119: 25—35
- Melancon S, Fryer B J, Markham J L, 2009. Chemical analysis of endolymph and the growing otolith: fractionation of metals in freshwater fish species. Environmental Toxicology and Chemistry, 28(6): 1279—1287
- Ophel I L, Judd J M, 1968. Marking fish with stable strontium. Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 25(7): 1333—1337
- Panfili J, Darnaude A M, Vigliola L *et al*, 2015. Experimental evidence of complex relationships between the ambient salinity and the strontium signature of fish otoliths. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 467: 65—70
- Radtke R L, Shafer D J, 1992. Environmental sensitivity of fish otolith microchemistry. Australian Journal of Marine and Freshwater Research, 43(5): 935—951
- Ren D N, Meyers M A, Zhou B *et al*, 2013. Comparative study of carp otolith hardness: lapillus and asteriscus. Materials Science and Engineering: C, 33(4): 1876—1881
- Schroder S L, Knudsen C M, Volk E C, 1995. Marking salmon fry with strontium chloride solutions. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 52(6): 1141—1149
- Sturrock A M, Hunter E, Milton J A *et al*, 2015. Quantifying physiological influences on otolith microchemistry. Methods in Ecology and Evolution, 6(7): 806—816
- Sturrock A M, Trueman C N, Milton J A *et al*, 2014. Physiological influences can outweigh environmental signals in otolith microchemistry research. Marine Ecology Progress Series, 500: 245—264
- Tzeng W N, 1994. Temperature effects on the incorporation of strontium in otolith of Japanese eel *Anguilla japonica*. Journal of Fish Biology, 45(6): 1055—1066
- Tzeng W N, 1996. Effects of salinity and ontogenetic movements on strontium: calcium ratios in the otoliths of the Japanese eel, *Anguilla japonica* Temminck and Schlegel. Journal of Experimental Marine Biology & Ecology, 199(1): 111—122
- 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
- Wickström H, Sjöberg N B, 2014. Traceability of stocked eels—the Swedish approach. Ecology of Freshwater Fish, 23(1): 33—39
- Yamada S B, Mulligan T J, 1987. Marking nonfeeding salmonid fry with dissolved strontium. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 44(8): 1502—1506
- Yamada S B, Mulligan T J, Fairchild S J, 1979. Strontium marking of hatchery-reared coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*, Walbaum). Journal of Fish Biology, 14(3): 267—275
- Yang J, Arai T, Liu H *et al*, 2006. Reconstructing habitat use of *Coilia mystus* and *Coilia ectenes* of the Yangtze River estuary, and of *Coilia ectenes* of Taihu Lake, based on otolith strontium and calcium. Journal of Fish Biology, 69(4): 1120—1135
- Yokouchi K, Fukuda N, Shirai K *et al*, 2011. Time lag of the response on the otolith strontium/calcium ratios of the Japanese eel, *Anguilla japonica* to changes in strontium/calcium ratios of ambient water. Environmental Biology of Fishes, 92(4): 469—478
- Zlokovitz E R, Secor D H, Piccoli P M, 2003. Patterns of migration in Hudson River striped bass as determined by otolith microchemistry. Fisheries Research, 63(2): 245—259

CHARACTERISTICS OF OTOLITH STRONTIUM MARKING AND ITS TIME LAGS OF LARVAL *CYPRINUS CARPIO*

QIU Chen¹, JIANG Tao², CHEN Xiu-Bao², LIU Hong-Bo², YANG Jian^{1,2}

(1. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China; 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 We selected the larval common carp (*Cyprinus carpio*) as a targeted fish and immersed the fish in $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ solution for 2d to understand the effect of Sr-marking and the time lag characteristics of the appearance and completion of corresponding marking. The results show no obvious effect of Sr-marking on mortality and growth of the fish. The marking rings on common carp otoliths were clear as detected by X-ray electron microprobe microanalysis (EPMA). The Sr/Ca ratio along line transects from the core (0 μm) to the edge of the otoliths shows a significant elevated range in the treatment group. Meanwhile, a clear marking ring of high-Sr content is visible in otolith of Sr-marked *C. carpio*, and the ring remained detectable in 5—250 days after the immersion. In addition, time lags of 3- and 6-day were found between the first day of immersion and the day of Sr appearance in otolith, and between the last day of immersion and the day of Sr disappearance in otolith, respectively. The present approach of exogenous Sr-marking provides a useful otolith-marking tool for larval *C. carpio*, and it is stable, reliable, and feasible.

Key words *Cyprinus carpio*; otolith; strontium marking; artificial enhancement release; X-ray electron probe microanalysis